

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

Bedeutung der Thrombomodulin – EPCR Signaltransduktion für die  
Gefäßneubildung nach Ischämie

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

Vorgelegt von

Stefanie Andrea Großmann  
aus Ulm

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhalte dieser Arbeit befinden sich im Rahmen einer Veröffentlichung momentan unter Begutachtung bei einer internationalen, *peer-reviewed* wissenschaftlichen Zeitschrift.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation .....	1
2 Literaturdiskussion .....	3
2.1 Endothelzellen nehmen Einfluss auf verschiedene vaskuläre und intravasale Prozesse .....	3
2.1.1 Die primäre und sekundäre Hämostase.....	3
2.1.2 Fibrinolyse .....	6
2.1.3 Endogener Mechanismus der Gerinnungshemmung .....	7
2.1.4 Funktionen von Protein C .....	8
2.1.4.1 Thrombomodulin und seine Interaktion mit Protein C .....	8
2.1.4.2 Der Endotheliale Protein C Rezeptor.....	10
2.1.4.3 Der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1) – Interaktion mit Thrombin und Aktiviertem Protein C .....	11
2.2 Der Endotheliale Protein C Rezeptor als Marker für Stammzellen.....	13
2.3 Prozesse der Gefäßneubildung.....	14
2.3.1 Angiogenese.....	14
2.3.2 Arteriogenese .....	16
2.3.3 Vaskulogenese .....	16
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material .....	18
3.1.1 Chemikalien.....	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.3 Geräte .....	21
3.1.4 Software .....	22
3.1.5 Antikörper .....	23

3.1.5.1	Primärantikörper.....	23
3.1.5.2	Sekundärantikörper.....	25
3.1.6	Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen.....	26
3.1.6.1	Lösungen für die Gewebeverarbeitung.....	26
3.1.6.2	Lösungen für histologische Färbungen.....	26
3.1.6.3	Lösungen für Immunfluoreszenzfärbungen .....	27
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Versuchstiere.....	28
3.2.2	Charakterisierung der verschiedenen Mausstämmе .....	28
3.2.2.1	Charakterisierung des Mausstamms TM <sup>Pro/Pro</sup> .....	28
3.2.2.2	Charakterisierung des Mausstamms EPCR <sup>fl/fl</sup> Tie2.Cre.....	29
3.2.2.3	Charakterisierung des Mausstamms PAR1 <sup>-/-</sup> .....	30
3.2.3	Genotypisierung der TM <sup>Pro/Pro</sup> Mäuse.....	31
3.2.4	Maus-Modell zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie.....	33
3.2.5	<i>Laser Doppler Perfusion Imaging</i> .....	34
3.2.6	Gewebepräparation und -verarbeitung .....	35
3.2.7	Histologische Färbungen .....	36
3.2.7.1	Siriusrot-Färbung .....	36
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbungen .....	36
3.2.8.1	Standardprotokoll.....	38
3.2.9	Isolation primärer muriner pulmonaler Endothelzellen .....	40
3.2.10	Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen.. ..	40
3.2.11	Statistische Auswertung .....	41
4	Ergebnisse .....	42
4.1	Bessere Reperfusion und erhöhte Endothelzellzahl bei TM <sup>Pro/Pro</sup> Mäusen im Vergleich zu TM <sup>WT/WT</sup> Kontrolltieren.....	42
4.2	Unterschiedliche Wiederherstellung der Durchblutung nach Ischämie bei TM <sup>Pro/Pro</sup> Mäusen mit homogenem C57BL/6J oder C57BL/6N Hintergrund.....	47

4.3	Erhöhte EPCR Expression bei 129/SvPas-C57BL/6 TM <sup>Pro/Pro</sup> Mäusen.....	49
4.4	Reduzierte endotheliale EPCR Expression bei EPCR <sup>fl/fl</sup> Tie2.Cre <sup>+</sup> Mäusen..	53
4.5	(Immun-)histochemische Charakterisierung des <i>M. gastrocnemius</i> nach einseitig induzierter Ischämie bei EPCR <sup>fl/fl</sup> und EPCR <sup>fl/fl</sup> Tie2.Cre <sup>+</sup> Mäusen .....	55
4.5.1	Immunhistochemischer Nachweis von Gewebe-Hypoxie mittels Carboanhydrase IX .....	55
4.5.2	Immunhistochemischer Nachweis von Makrophagen .....	57
4.5.3	Immunhistochemischer Nachweis von Zellproliferation mittels PCNA...	59
4.5.4	Immunhistochemischer Nachweis von apoptotischen Zellen .....	60
4.5.5	Histochemische Analysen von endothelialer-zu-mesenchymaler-Transition .....	62
4.5.6	Histochemischer Fibrose-Nachweis mittels Siriusrot und Polarisationsmikroskopie .....	65
4.5.7	Histochemische Visualisierung der Muskelfasern mittels <i>Wheat Germ Agglutinin</i> .....	66
4.6	Das Fehlen von EPCR in Tie2-positiven Zellen reduziert die Wiederherstellung der Perfusion nach Ischämie .....	68
4.7	Das Fehlen von EPCR in LysM.Cre-positiven myelomonozytären Zellen hat keine Auswirkungen auf die Wiederherstellung der Durchblutung nach Ischämie.	72
4.8	Das Fehlen von PAR1 verzögert die Wiederherstellung der Gewebepерfusion nach Ischämie .....	74
5	Diskussion.....	77
5.1	Vermehrte Thrombin Expression in Thrombomodulin-mutierten Mäusen fördert die Gefäßneubildung nach Ischämie .....	77
5.2	Der proangiogenetische Phänotyp der Mäuse mit einer Punktmutation im Thrombomodulin-Gen zeigt sich nur in Kombination mit vermehrter endothelialer EPCR Expression.....	79
5.3	EPCR stellt entscheidenden Faktor im Prozess der Angiogenese dar .....	80
5.4	Die Angiogenese wird primär durch die aPC-vermittelte PAR1 Signalübertragung induziert.....	82

5.5	Das Fehlen von EPCR auf Tie2-exprimierenden Zellen führt zu vermehrter Gewebhypoxie, Entzündungsreaktion und Apoptose von Endothelzellen .....	84
5.6	Die Zellproliferation wird nicht von der reduzierten EPCR Expression beeinflusst .....	86
5.7	Postischämische Gewebhypoxie führt zu vermehrter endothelialer-zu-mesenchymaler-Transition und folglich zu mehr Fibrosebildung.....	87
6	Zusammenfassung.....	90
7	Literaturverzeichnis .....	92
8	Danksagung .....	X

## Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS 13	<i>A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin Type 1 Repeats-13</i>
ADP	Adenosindiphosphat
aPC	aktiviertes Protein C
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EndMT	endotheliale-zu-mesenchymale-Transition
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
EPC	Endothelvorläuferzelle
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
FGF1	<i>Fibroblast Growth Factor 1</i>
HIF	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
LDPI	<i>Laser Doppler Perfusion Imaging</i>
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCI	Protein C Inhibitor
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR $\beta$	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor beta</i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean (Standardfehler)</i>



SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i>
TAFI	Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor
TF	<i>Tissue Factor</i> (Gewebsthromboplastin)
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>1</i>
TM	Thrombomodulin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
t-PA	<i>tissue-type Plasminogen Activator</i>
u-PA	<i>urokinase-type Plasminogen Activator</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Chemikalien.....	19
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 3: Geräte .....	22
Tabelle 4: Software .....	22
Tabelle 5: Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen .....	24
Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen.....	25
Tabelle 7: Lösungen für die Gewebeerarbeitung .....	26
Tabelle 8: Lösungen für histologische Färbungen .....	26
Tabelle 9: Lösungen für Immunfluoreszenzfärbungen.....	27
Tabelle 10: Abweichungen vom Standardprotokoll für Immunfluoreszenzfärbungen	39

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade .....	6
Abbildung 2: Ergebnis der Genotypisierung der Mauslinie $TM^{Pro/Pro}$ .....	32
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Operationsmethode zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie .....	33
Abbildung 4: Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) Methode .....	34
Abbildung 5: Gefäßneubildung nach Ischämie bei 129/SvPas-C57BL/6 $TM^{Pro/Pro}$ Mäusen und deren $TM^{WT/WT}$ Kontrolltieren .....	43
Abbildung 6: Darstellung von CD31-immunpositiven Zellen und Zellkernen (DAPI) bei 129/SvPas-C57BL/6 $TM^{Pro/Pro}$ Mäusen und deren $TM^{WT/WT}$ Kontrolltieren .....	44
Abbildung 7: Quantifizierung von CD31-immunpositiven Zellen sowie der Gesamtzellzahl bei 129/SvPas-C57BL/6 $TM^{Pro/Pro}$ Mäusen und deren $TM^{WT/WT}$ Kontrolltieren.....	46
Abbildung 8: Gefäßneubildung nach Ischämie bei $TM^{Pro/Pro}$ und $TM^{WT/WT}$ Mäusen mit einem C57BL/6J oder C57BL/6N genetischen Hintergrund.....	48
Abbildung 9: Analyse der endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) Expression sowie dessen Einfluss auf die Wiederherstellung der Durchblutung nach Induktion einer Hinterlaufischämie .....	52
Abbildung 10: EPCR Expression auf Endothelzellen bei Mäusen der Mauslinien $EPCR^{fl/fl}$ und $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$ .....	54
Abbildung 11: Darstellung und Quantifizierung von Carboanhydrase (CAIX)-immunpositiven Zellen als Hypoxie Marker im Hinterlauf von $EPCR^{fl/fl}$ und $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$ Mäusen.....	56
Abbildung 12: Darstellung und Quantifizierung von Mac2-positiven Makrophagen im Hinterlauf von $EPCR^{fl/fl}$ und $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$ Mäusen .....	58
Abbildung 13: Darstellung und Quantifizierung von Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-immunpositiven Zellen als Marker der Zellproliferation im Hinterlauf von $EPCR^{fl/fl}$ und $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$ Mäusen.....	59
Abbildung 14: Darstellung und Quantifizierung von p53-immunpositiven Zellen als Marker für apoptotische Zellen im Hinterlauf von $EPCR^{fl/fl}$ und $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$ Mäusen .....	61
Abbildung 15: CD31/SMA doppelt immunpositive Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT .....	63
Abbildung 16: Quantifizierung der CD31/SMA doppelt immunpositiven Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT .....	63

Abbildung 17: CD31/PDGFR $\beta$ doppelt immunpositive Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT .....	64
Abbildung 18: Quantifizierung der CD31/PDGFR $\beta$ doppelt immunpositiven Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT .....	64
Abbildung 19: Darstellung von Kollagenfasern und deren Quantifizierung als Zeichen von Fibrose .....	65
Abbildung 20: Wheat Germ Agglutinin (WGA) Fluoreszenzfärbung zur Ermittlung der Muskelfaserfläche in $\mu\text{m}^2$ .....	67
Abbildung 21: Reduzierte Gefäßneubildung nach Ischämie bei Mäusen, denen EPCR in Tie2.Cre exprimierenden Zellen fehlt.....	69
Abbildung 22: Darstellung und Quantifizierung von CD31-immunpositiven Zellen sowie der Gesamtzellzahl bei EPCR <sup>fl/fl</sup> und EPCR <sup>fl/fl</sup> Tie2.Cre <sup>+</sup> Mäusen.....	71
Abbildung 23: Reperfusion nach Ischämie bei EPCR <sup>fl/fl</sup> und EPCR <sup>fl/fl</sup> LysM.Cre <sup>+</sup> Mäusen .....	73
Abbildung 24: Reperfusion nach Ischämie bei Mäusen mit fehlendem PAR1 Gen bzw. R41Q oder R46Q punktmutiertem PAR1 Gen .....	76

## **1 Einleitung / Ziel der Dissertation**

Die Neubildung von Blutgefäßen spielt, neben ihrer zentralen Rolle bei physiologischen Prozessen wie der Embryogenese oder der Wundheilung, eine wichtige Rolle bei vielen Pathologien, wie beispielsweise bei kardiovaskulären Erkrankungen oder Tumorleiden (1). Endothelzellen, welche das gesamte Gefäßsystem unseres Körpers auskleiden, besitzen im gesunden Zustand protektive Fähigkeiten und wirken durch ihre hemmende Wirkung auf die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten oder Entzündungszellen der intravasalen Thrombenbildung entgegen (2). Darüber hinaus tragen in Thromben einsprossende Endothelzellen auch zur Auflösung von Blutgerinnseln und Wiederherstellung der Durchblutung bei (3, 4). Auf ihrer luminalen Oberfläche exprimieren Endothelzellen unter anderem das transmembrane Glykoprotein Thrombomodulin (TM), welches an der Vermittlung ihrer antikoagulatorischen Eigenschaften beteiligt ist (5). TM ist in der Lage den Gerinnungsfaktor Thrombin zu binden, wodurch dessen koagulatorische Eigenschaften gehemmt und gleichzeitig die Aktivierung von Protein C gefördert wird. Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein, welches durch irreversible, proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa sowie durch den hemmenden Einfluss auf die Thrombin-Generierung antikoagulatorische Wirkung aufweist (6). Die Aktivierung von Protein C durch den TM-Thrombin-Komplex kann durch dessen Bindung an den auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimierten endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) noch weiter gesteigert werden (7). Darüber hinaus stellt der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1) einen weiteren wichtigen Rezeptor auf der Oberfläche von Endothelzellen dar, der abhängig von der ihn aktivierenden Protease unterschiedliche Signalwege in Gang setzen kann (8). Durch Bindung von Thrombin und proteolytische Abspaltung eines Liganden werden proinflammatorische, prothrombotische und apoptotische Eigenschaften vermittelt, hingegen induziert die proteolytische Spaltung durch aktiviertes Protein C (aPC) zytoprotektive, antiinflammatorische und antithrombotische Signalwege.

Bereits vorhandene klinische Daten deuten auf eine entscheidende Rolle der Hemmung der Blutgerinnung bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen hin, um deren Risiko für das Auftreten ischämischer Ereignisse zu reduzieren. Eine verminderte Expression von EPCR oder TM konnte mit dem vermehrten Auftreten koronarer Thromben sowie Myokardinfarkten assoziiert werden (9, 10). Ob und über welche Mechanismen Gerinnungsfaktoren die postischämische Neubildung von

Gefäßen sowie die Regenerierung von geschädigtem Gewebe beeinflussen, ist hingegen noch unzureichend verstanden.

In der vorliegenden Studie haben wir uns mit der zentralen Fragestellung beschäftigt, welchen Einfluss die endothelialen Rezeptoren TM und EPCR auf die Gefäßneubildung und die Wiederherstellung der Gewebepfusion nach einer Ischämie haben und ob hierfür die Thrombin-vermittelten oder die aPC-vermittelten Effekte von PAR1 von Bedeutung sind. Hierfür haben wir das Maus-Modell der unilateralen Hinterlauf-Ischämie herangezogen und Mäuse mit einer Punktmutation im TM-Gen oder einer globalen Deletion des PAR1-Gens bzw. Zell-spezifischen Deletion des EPCR untersucht. Die Durchblutung im Hinterlauf der Mäuse vor und nach einseitiger Induktion einer Ischämie wurde mittels der *Laser Doppler Perfusion Imaging* (LDPI) Methode gemessen, die Gefäßneubildung (Angiogenese) und weitere zelluläre Veränderungen in der Hinterlauf-Muskulatur (*M. gastrocnemius*) der Mäuse wurden mittels Immunfluoreszenz und spezifischen Antikörpern oder Zellmembran-bindenden Lectinen visualisiert und quantifiziert.

Neue Erkenntnisse zu den Mechanismen der protektiven und regenerativen Einflüsse von Endothelzellen könnten von wichtiger Bedeutung zur therapeutischen Beeinflussung der durch Endothelzellen-vermittelten Gefäßheilung sowie proangiogenetischer Prozesse sein. Dies könnte relevant sein für die Prävention, Revaskularisationstherapie und somit für eine verbesserte Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen, aber auch für ischämische und thrombotische Ereignisse.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Endothelzellen nehmen Einfluss auf verschiedene vaskuläre und intravasale Prozesse**

Alle Blutgefäße im Körper von Menschen und Tieren sind mit Endothelzellen ausgekleidet, sowohl im arteriellen als auch im venösen System. Endothelzellen haben die wichtige Funktion, eine regulierbare Barriere zwischen dem interstitiellen Raum und dem Gefäßlumen zu bilden. Das Endothel weist eine selektive Permeabilität auf, um das umliegende Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen zu können (11). Des Weiteren spielt das Endothel eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation, bei der Immunabwehr, der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese), der Hämostase und Fibrinolyse sowie bei der Hemmung von intravasaler Thrombenbildung (2). Ist das Endothel aktiviert oder besteht eine chronische Schädigung des Endothels, können kardiovaskuläre Folgeerkrankungen wie Bluthochdruck, koronare Herzerkrankung und peripher arterielle Verschlusskrankheit die Folge sein (2). Diese Erkrankungen entstehen durch den Prozess der Atherosklerose, einer Folge der Endothelschädigung (12). Hierbei erfolgt die Bildung lipidreicher Plaques in der Intima der Blutgefäße, wodurch das Gefäßlumen zunehmend stenosierte. Im Falle einer Plaqueruptur werden thrombogene Substanzen freigesetzt, durch Einsetzen der Blutgerinnung wird ein Thrombus gebildet, und es besteht die Gefahr eines kompletten Gefäßverschlusses (13, 14). Der genaue Ablauf der Blutgerinnung wird im folgenden Abschnitt 2.1.1 detailliert beschrieben.

#### **2.1.1 Die primäre und sekundäre Hämostase**

Der Prozess der Hämostase, auch als Blutgerinnung bezeichnet, wird aktiviert, sobald es zu einer Verletzung im Blutgefäßsystem kommt und dient der schnellen Wiederherstellung der Integrität und der Vermeidung von Blutverlust. Es lassen sich die primäre und sekundäre Hämostase voneinander unterscheiden. Bei der primären Hämostase stehen die Thrombozytenaggregation und -adhäsion sowie die Vasokonstriktion im Vordergrund. Bei der sekundären Hämostase werden Gerinnungsfaktoren aktiviert, die zu einem stabilen Verschluss der Wunde führen, um einen Blutverlust des Organismus zu verhindern. Solange das Endothel eine intakte Barriere bildet, verhindert es das Einsetzen der Hämostase. Zur Unterdrückung der unkontrollierten Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten kommen verschiedene Mediatoren zum Einsatz. Sowohl Prostazykline als auch Stickstoffmonoxid werden von

Endothelzellen gebildet und beeinflussen diesen Prozess wesentlich, indem sie zu einer Erhöhung der cAMP- bzw. cGMP-Spiegel in Thrombozyten führen und somit deren Aggregation verhindern (15). Zudem weisen Endothelzellen an ihrer apikalen Seite eine negativ geladene Oberfläche, die sogenannte Glykokalyx auf, welche aus Heparansulfat-Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht und das Anheften von Blutplättchen verhindert (16). Zusätzlich wandelt die endotheliale Ecto-ADPase CD39 das von aktivierten Thrombozyten gebildete ADP in Adenosin um, wodurch die Aktivierung weiterer Thrombozyten unterbunden wird (17). Sobald eine Schädigung des Endothels vorliegt, können Thrombozyten über den Von-Willebrand-Faktor (vWF) an das freiliegende Kollagen binden, die primäre Hämostase setzt ein. Der vWF ist ein im Blut zirkulierendes Glykoprotein und wird unter anderem von Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert, die Weibel-Palade-Körperchen stellen den Speicherort in Endothelzellen dar (18). Der vWF bindet bei Auftreten einer Gefäßverletzung an das Kollagen in der subendothelialen Schicht sowie an den auf der Thrombozytenmembran exprimierten Von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (GPIb-IX-V-Rezeptorkomplex) (19). Dadurch werden die Thrombozyten aktiviert. Es folgt eine Formveränderung der Blutplättchen und eine Aktivierung des Glykoproteinrezeptors GP IIb/IIIa auf deren Oberfläche, um eine bessere Vernetzung untereinander zu ermöglichen (20). Zusätzlich werden verschiedene Mediatoren wie Fibrinogen, vWF, Serotonin,  $Ca^{2+}$ , ADP und die Gerinnungsfaktoren V und VIII aus den Granula der aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet. Dies führt zu einer Vasokonstriktion und zur weiteren Thrombozytenadhäsion und -aggregation, ein weißer Thrombus wird gebildet und die Blutung gestillt (21). Um einen stabilen Wundverschluss bilden zu können, erfolgt nach der primären Hämostase die sekundäre Hämostase, auch als plasmatische Hämostase bezeichnet.

Die sekundäre Hämostase lässt sich aufteilen in das intrinsische (endogene) System und das extrinsische (exogene) System. Zentraler Bestandteil der Blutgerinnung ist der Gerinnungsfaktor Thrombin (Faktor IIa), welcher die Umwandlung von Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin (Faktor Ia) katalysiert, so dass ein stabiler Wundverschluss gebildet werden kann (22). Bevor allerdings die Aktivierung von Thrombin möglich ist, müssen zunächst andere Gerinnungsfaktoren der Gerinnungskaskade in ihre aktiven Formen überführt werden. Eine schematische Darstellung der Gerinnungskaskade kann **Abbildung 1** entnommen werden. Tritt eine Gewebeläsion auf und fällt die Barrierefunktion der Endothelzellen weg, können die frei im Blut zirkulierenden



Gerinnungsfaktoren mit Membranproteinen im subendothelialen Raum in Kontakt treten, das extrinsische System setzt ein. Zentrale Rolle spielt hierbei das Gewebethromboplastin (Faktor III), auch als Tissue Faktor (TF) bezeichnet, welches auf intakten Endothelzellen nicht exprimiert wird (19). In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  wandelt das Gewebethromboplastin den Gerinnungsfaktor VII in seine aktive Form (Faktor VIIa) um. Daraufhin bildet sich ein Komplex aus TF-VIIa- $\text{Ca}^{2+}$ -Phospholipiden, welcher Faktor X in Faktor Xa umwandelt. Die Umwandlung von Faktor X in seine aktive Form stellt gleichzeitig auch einen zentralen Schritt im intrinsischen System und somit eine gemeinsame Endstrecke der Gerinnungskaskade dar. Im Gegensatz zum extrinsischen System benötigt das intrinsische System keine externen Faktoren, sondern wird bei Kontakt mit subendotheliale Kollagen in Gang gesetzt. Zu Beginn wird der Gerinnungsfaktor XII in Faktor XIIa überführt, anschließend folgt eine Kaskade, bei der die Faktoren XI und IX in ihre aktiven Formen umgewandelt werden. Hinzu kommt Faktor VIII, welcher im Blut an den vWF gebunden vorliegt und während der primären Hämostase freigesetzt und durch Thrombin zu Faktor VIIIa aktiviert wird (19, 23). Der sich bildende Komplex aus Phospholipiden,  $\text{Ca}^{2+}$ , Faktor IXa und Faktor VIIIa wandelt dann Faktor X in Faktor Xa um. Anschließend folgt die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Systems, wobei der Xa-Va- $\text{Ca}^{2+}$ -Phospholipid-Komplex an der Oberfläche von Thrombozyten die Umwandlung des Gerinnungsfaktors Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa) katalysiert. Anschließend kann ein stabiler Wundverschluss gebildet werden, indem Thrombin die Aktivierung von Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin (Faktor Ia) bewirkt und somit ein Fibrinnetz zwischen den Thrombozyten gebildet werden kann. Durch Einlagerung von Erythrozyten entsteht ein roter Thrombus.

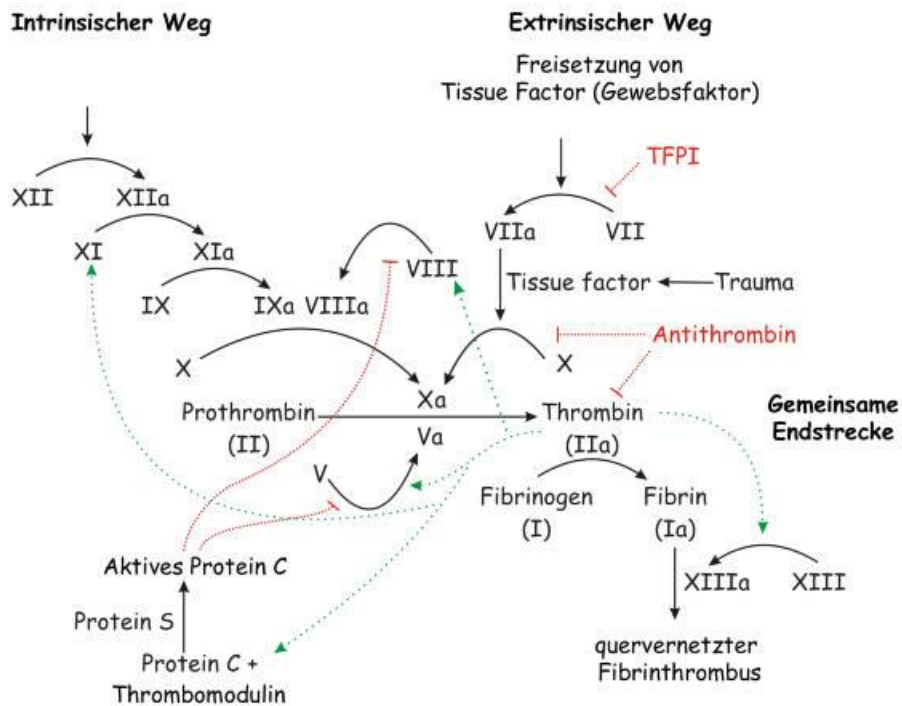


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade

Quelle: <https://pictures.doccheck.com/de/photo/15958-gerinnungskaskade-schema>

### 2.1.2 Fibrinolyse

Um die Wiederherstellung der Durchgängigkeit von Blutgefäßen nach durchlaufener Wundheilung in Folge einer Verletzung und Thrombose sicherstellen zu können, erfolgt der Abbau des Thrombus durch den Prozess der Fibrinolyse. Die Aktivierung der Fibrinolyse erfolgt vor allem durch zwei Faktoren, den Gewebeplasminogenaktivator (t-PA, *tissue-type Plasminogen Activator*) sowie das Enzym Urokinase (u-PA, *urokinase-type Plasminogen Activator*) (24). Die Freisetzung von t-PA erfolgt in Form einer negativen Rückkopplung durch eine Thrombin-abhängige Aktivierung von Endothelzellen, welche daraufhin t-PA aus ihren Weibel-Palade-Körperchen entlassen (25). Das Enzym Urokinase kann hingegen zusätzlich zu den Endothelzellen auch noch von Makrophagen und manchen Tumorzellen gebildet werden (19). t-PA und u-PA sorgen für die Umwandlung des im Blutplasma vorhandenen inaktiven Proenzym Plasminogen in das aktive Enzym Plasmin (26). Plasmin ist eine Protease, die das Fibrinnetz in lösliche Peptide spaltet und somit die Durchgängigkeit des Blutgefäßes nach einer Verletzung wiederherstellt. Zusätzlich hat Plasmin einen hemmenden Einfluss auf das Gerinnungssystem. Eine übermäßige Fibrinolyse kann auf Ebene des Plasminogens durch den Thrombin-aktivierbaren

Fibrinolyse-Inhibitor (TAFI) und den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), auf Ebene des Plasmins durch das Enzym  $\alpha_2$ -Antiplasmin verhindert werden (26).

### **2.1.3 Endogener Mechanismus der Gerinnungshemmung**

Neben dem Einfluss der Endothelzellen auf die Hämostase, Bildung von Thromben und Fibrinolyse spielen diese auch eine entscheidende Rolle im Prozess der Gerinnungshemmung, pharmakologisch auch als Antikoagulation bezeichnet. Die Gerinnungshemmung stellt ebenso wie die Fibrinolyse die Durchgängigkeit von Blutgefäßen sicher und verhindert eine überschießende und ungewollte Hämostase (22). Verschiedene Protease-Inhibitoren wirken hemmend auf Faktoren der Gerinnungskaskade. Antithrombin, welches in der Leber produziert wird, stellt dabei ein wichtiges Protein dar, welches zu 80 % für die Hemmung von Thrombin, dem zentralen Bestandteil der sekundären Hämostase, verantwortlich ist (27). Des Weiteren bewirkt Antithrombin durch Komplexbildung eine Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa und XIIa. Die Wirkung von Antithrombin kann durch Heparin sowie durch Heparansulfat, welches sich physiologisch auf der Oberfläche von Endothelzellen befindet, verstärkt werden (28). Von Endothelzellen gebildet wird auch der *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI), dessen Expression auch auf aktivierten Monozyten und Blutplättchen nachgewiesen werden konnte (29). TFPI besteht aus drei Domänen, die eine hemmende Wirkung auf den Komplex aus Faktor VIIa/TF sowie auf Faktor Xa haben und somit Einfluss auf die sekundäre Hämostase nehmen (30). In klinischen Studien konnte festgestellt werden, dass niedrige TFPI Spiegel zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von tiefen Beinvenenthrombosen, Schlaganfällen und koronarer Herzkrankheit führen (31, 32). Neben Antithrombin und TFPI nehmen weitere Proteine wie C1-Inhibitoren, alpha 2-Antiplasmin und alpha 1-Antitrypsin wichtige Rollen in der Gerinnungshemmung ein, indem sie Faktor XIa des intrinsischen Weges der sekundären Hämostase hemmen (33). ADAMTS-13 (*A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin Type 1 Repeats-13*) ist eine Metalloproteinase, welche in Endothelzellen hergestellt und auf deren Oberfläche exprimiert wird (34). ADAMTS-13 reduziert die Plättchenaggregation, indem es große vWF Multimere spaltet (35). Eine verminderte oder fehlende Expression von ADAMTS-13 stellt den Pathomechanismus der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura dar (36), außerdem besteht durch die erhöhten vWF Spiegel und die daraus resultierende

erhöhte Thrombozytenaggregation ein verstärktes Schlaganfall- und Herzinfaktrisiko (37, 38).

Endothelzellen nehmen nicht nur über die Bereitstellung von Protease-Inhibitoren Einfluss auf die Gerinnungshemmung, sondern verhindern durch die Expression verschiedener Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und deren Wechselwirkung mit Plasmaproteinen eine unkontrollierte, intravasale Thrombenbildung. Im Folgenden soll näher auf diese Prozesse eingegangen werden.

### **2.1.4 Funktionen von Protein C**

Protein C ist ein in der Leber synthetisiertes Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein (39), welches mit verschiedenen zellulären Proteinrezeptoren und Gerinnungsfaktoren interagieren kann, wodurch antikoagulatorische und zytoprotektive Effekte ausgelöst werden. Die Protein C-Rezeptoren, zu denen Thrombomodulin (TM), der Endotheliale Protein C Rezeptor (EPCR) und Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) gehören, werden unter anderem auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert (6). In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Protein C-Rezeptoren und deren Wechselbeziehungen mit Protein C näher beschrieben.

#### **2.1.4.1 Thrombomodulin und seine Interaktion mit Protein C**

Thrombomodulin (TM) ist ein Transmembranprotein, welches auf der luminalen Oberfläche von Endothelzellen in Arterien, Venen, Kapillaren und lymphatischen Gefäßen exprimiert wird (40). Das Vorhandensein von TM konnte nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf weiteren Zellen, unter anderem auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen, Monozyten und Trophoblasten der Plazenta nachgewiesen werden (5). TM spielt eine wichtige Rolle in den Prozessen der Gerinnungshemmung und Fibrinolyse, aber auch bei inflammatorischen Vorgängen oder der Embryogenese (41). Bei TM handelt es sich um ein Typ 1 transmembranes Glykoprotein, welches aus einer *lectin-like amino-terminal* Domäne (D1), einer Domäne aus sechs *Epidermal Growth Factor (EGF)-like* Strukturen (D2), einer O-glykolysierten Serin/Threonin-reichen Domäne (D3), einem hydrophoben sowie einem transmembranen Segment (D4) und einem zytoplasmatischen Endstück besteht (D5) (42, 43). Bereits in den 1980er Jahren wurde die Fähigkeit von TM erkannt, die Serin-Protease Thrombin zu binden und dadurch

Einfluss auf das antikoagulatorische Protein C-System zu nehmen (5). Entscheidend für die Interaktion von TM mit Thrombin sind die *EGF-like* Domänen 5 und 6 des TM, an die Thrombin über seine Bindungsstellen I und II bindet (44, 45). Um als Kofaktor im Prozess der Protein C-Aktivierung wirken zu können, sind die *EGF-like* Domänen 4-6 sowie die Serin/Threonin-reiche Domäne des TM entscheidend (46). Durch die Bindung von Thrombin an TM werden verschiedene Prozesse beeinflusst, unter anderem wird die katalytische Wirkung des Thrombins auf Fibrinogen und die aktivierende Wirkung auf den Gerinnungsfaktor V blockiert (39). Zusätzlich wird die Konzentration des frei im Blut zirkulierenden Thrombins reduziert, indem es durch die Bindung an TM zu einem 20-fach verstärkten Abbau des Thrombins durch Plasma Protease-Inhibitoren kommt (47). Des Weiteren führt die Bindung von Thrombin an TM zu einer deutlich verstärkten Aktivierung des Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyse-Inhibitors (TAFI), auch als Carboxypeptidase B2 bezeichnet, was zu einer Hemmung der Fibrinolyse und somit zur Stabilisierung von Fibrinablagerungen führt (45, 48). Als weitere wichtige Auswirkung des Thrombin-TM Komplexes wird eine verstärkte Aktivierung von Protein C induziert. Die Fähigkeit von Thrombin, Protein C zu aktivieren, wird durch dessen Bindung an TM um ein mehr als 1000-faches verstärkt (49). Aktiviertes Protein C (aPC) ist bekannt für seine antikoagulatorische Wirkung durch irreversible, proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa, was folglich zu einer reduzierten Thrombin-Generierung führt (47, 50). Hierfür benötigt aPC als Kofaktoren das ebenfalls Vitamin K-abhängige Protein S sowie Faktor V in seiner intakten Form, wodurch Faktor V sowohl eine gerinnungsfördernde als auch eine gerinnungshemmende Rolle zukommt (51). Als zusätzliche Kofaktoren werden *High-density-Lipoproteine*, anionische Phospholipide und Glycosphingolipide benötigt (6). Für die Inaktivierung von Faktor Va durch aPC ist die Anwesenheit von Protein S ausreichend, für die Inaktivierung von Faktor VIIIa müssen beide Kofaktoren, Protein S und Faktor V, vorhanden sein (50). Protein S hat zusätzlich noch eine hemmende Wirkung auf Faktor IXa (52). Nachdem aPC die genannten Gerinnungsfaktoren gespalten hat, wird es selbst durch das Plasma-Glykoprotein Protein C Inhibitor (PCI) inaktiviert (53). Liegt eine aPC-Resistenz vor, besteht ein erhöhtes Risiko für die Entstehung thrombotischer Ereignisse, vor allem im venösen System (54). Die Faktor V Leiden Mutation ist die bekannteste aPC-Resistenz, bei der eine angeborene Mutation des für Faktor V kodierenden Gens dafür sorgt, dass aPC den Gerinnungsfaktor V nicht proteolytisch inaktivieren kann (55).

In klinischen Studien wurde herausgefunden, dass verschiedene Mutationen des TM Gens zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von arteriellen Thrombosen und für das Auftreten eines Myokardinfarktes führen (10, 56). Liegt bereits eine koronare Atherosklerose vor, kann eine reduzierte Expression von TM beobachtet werden (9), was für eine vermehrte Koagulation und Entstehung von Thromben verantwortlich gemacht wird (41).

### 2.1.4.2 Der Endotheliale Protein C Rezeptor

Ein weiterer wichtiger Rezeptor auf der Oberfläche von Endothelzellen, der ebenso wie TM Einfluss auf die Gerinnungshemmung nimmt, ist der Endotheliale Protein C Rezeptor (EPCR). EPCR ist in der Lage, Protein C/aPC über dessen Gamma Carboxyglutaminsäure (Gla) Domäne zu binden und dadurch die Aktivierung von Protein C durch den Thrombin-TM Komplex um ein weiteres 20-faches zu intensivieren (7).

EPCR ist ein Typ 1 transmembranes Glykoprotein und gehört zur Gruppe der *Major Histocompatibility Complex (MHC) class 1/CD1* Familie. Es besteht aus einer transmembranen Domäne nahe dem Carboxyl-Ende, einer Signalsequenz am Amino-Ende, einer kurzen zytosolischen Domäne sowie 4 potentiellen N-Glycosylierungsstellen (57). Zusätzlich besitzt EPCR zwei extrazelluläre Domänen. EPCR kann sowohl in gebundener Form als auch in löslicher Form frei im Plasma vorliegen (58). In gebundener Form wird EPCR vorwiegend auf der Oberfläche von Endothelzellen in Arterien und Venen exprimiert, im Gegensatz zu TM kann es kaum auf Kapillaren nachgewiesen werden (59). Ausnahmen sind unter anderem die EPCR Expression in Lebersinusoiden sowie die Kapillaren des Nierenmarks. In einer Studie von *Laszik et al.* wurde gezeigt, dass die EPCR Dichte mit der Größe der Blutgefäße zunimmt (59). Je größer das Gefäß, umso größer ist der aktivierende Einfluss von EPCR auf das Protein C System. In Arterien sind die Spiegel der EPCR Expression höher als in Venen derselben Größe. Liegt ein Mangel an EPCR vor, besteht ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer arteriellen Thrombose (59). Bei Patienten mit bereits bestehender Atherosklerose konnte eine reduzierte Expression von EPCR auf der endothelialen Oberfläche festgestellt werden (9). Anders verhält sich dagegen TM in Bezug auf die Dichte der Expression abhängig der Größe der Gefäße. Durch die Annahme, dass jede Endothelzelle etwa 50 000 TM Moleküle exprimiert (60), hat TM in kleinen Kapillaren einen größeren Einfluss auf Protein C als in größeren Gefäßen

(59). Dem entgegen wirkt die bereits erläuterte erhöhte Expression von EPCR in Gefäßen mit größerem Durchmesser.

Die ursprüngliche Annahme, dass EPCR ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird, wurde mittlerweile durch dessen Nachweis auf einigen anderen Zelltypen wie Eosinophilen, Monozyten, Neutrophilen, glatten Muskelzellen, Keratinozyten, Kardiomyozyten, Neuronen des Hippocampus sowie Trophoblasten der Plazenta widerlegt (61). In einer neuen Studie von *Fager et al.* wurde gezeigt, dass EPCR außerdem auf aktivierten Blutplättchen exprimiert wird (62). Als Ligand dient nicht nur Protein C/aPC, sondern auch die Faktoren VII/VIIa können mit einer ähnlichen Affinität an EPCR binden (63). Die genauen Auswirkungen der Bindung dieser Gerinnungsfaktoren an EPCR sind bisher nicht vollständig geklärt.

Neben dem Einfluss des EPCR auf das Protein C System konnte in einer Studie von *Gu et al.* nachgewiesen werden, dass EPCR außerdem eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung übernimmt (64). Versuche mit Mäusen zeigten, dass die Embryonen, bei denen EPCR homozygot ausgeschaltet ist, bereits intrauterin versterben. Grund dafür sind Fibrin-Ablagerungen sowie die Entstehung von Thrombosen im Bereich der Trophoblasten, welche normalerweise eine hohe EPCR Expression aufweisen.

Eine weitere wichtige Eigenschaft des EPCR ist die antientzündliche Wirkung, welche aPC-abhängig ist (63). EPCR verstärkt die Bereitstellung des aPC, welches mit dem Protease-aktivierten Rezeptor 1 interagiert, wobei EPCR als Kofaktor des aPC dient. Detailliert wird dieser Prozess im folgenden Abschnitt 2.1.4.3 erklärt.

### **2.1.4.3 Der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1) – Interaktion mit Thrombin und Aktiviertem Protein C**

Neben TM und EPCR ist der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1) ebenfalls ein entscheidender Protein C-Rezeptor (6). PAR1 gehört zu einer Untergruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, zu der drei weitere Protease-aktivierte Rezeptoren gehören - PAR2, PAR3 und PAR4 (65). Im Jahr 1991 wurde PAR1 zunächst als Rezeptor für Thrombin auf der Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen entdeckt (66), mittlerweile ist seine Funktion auch als endothelialer Rezeptor für aPC erforscht (67). Die vier Protease-aktivierten Rezeptoren werden auf unterschiedlichen Zellen exprimiert, auf Endothelzellen beispielsweise PAR1 und PAR2, wodurch

verschiedene intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt werden (8). Die Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren kann neben Thrombin, welches PAR1, PAR3 und PAR4 aktivieren kann, selektiv auch noch durch weitere Gerinnungsfaktoren und Proteasen erfolgen. Hierbei kommt es zur irreversiblen proteolytischen Abspaltung der extrazellulären N-terminalen Domäne der Protease-aktivierten Rezeptoren, wodurch die freigelegte Stelle als neuer Ligand mit den noch vorhandenen extrazellulären Anteilen des eigenen Rezeptors interagieren kann (68). Dies führt zur Übermittlung intrazellulärer Signale durch G-Proteine oder  $\beta$ -Arrestin (69). Manche Proteasen benötigen bestimmte Kofaktoren, um die Protease-aktivierten Rezeptoren effektiv zu aktivieren. Beispielsweise können auf Endothelzellen lokalisierte PAR1 von aPC nur in Anwesenheit von EPCR gespalten und somit aktiviert werden (65). Abhängig von der aktivierenden Protease und der Stelle der proteolytischen Spaltung, sind die Protease-aktivierten Rezeptoren in der Lage, völlig unterschiedliche, auch gegensätzliche, Signalwege in Gang zu setzen (8). Der auf Endothelzellen lokalisierte PAR1 kann sowohl entzündliche als auch anti-entzündliche Mechanismen vermitteln, abhängig davon, ob PAR1 durch Thrombin oder aPC aktiviert wird (70). Bei der Aktivierung des PAR1 durch Thrombin erfolgt die proteolytische Spaltung des N-Terminus bei der Aminosäure Arg41 (71), woraufhin durch G-Proteine intrazelluläre Signalwege stimuliert werden (72), welche in der Folge die Permeabilität der endothelialen Barriere reduzieren sowie proinflammatorische, prothrombotische und apoptotische Auswirkungen haben (73). Trotz der drei- bis vierfach höheren Effektivität von Thrombin, PAR1 proteolytisch zu spalten, gelingt es aPC dennoch, in Anwesenheit von EPCR, gegensätzliche Signalwege durch denselben Protease-aktivierten Rezeptor in Gang zu setzen (70, 74). Dies gelingt durch die Fähigkeit des aPC, die proteolytische Spaltung des Rezeptors nicht nur an der Aminosäure Arg41 durchzuführen, sondern auch an der Aminosäure Arg46 (72, 75). Die Spaltung des PAR1 an dieser zusätzlichen Aminosäure ermöglicht es, die zytoprotektiven Eigenschaften des aPC über  $\beta$ -Arrestin 2 nach intrazellulär zu leiten (72). Zu diesen Eigenschaften zählen antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte sowie die Stabilisierung der endothelialen Barriere (76). Da Thrombin die entscheidende Protease für die Umwandlung von Protein C zu aPC ist, hat es neben der eigenen proinflammatorischen Wirkung indirekt auch eine entzündungshemmende Wirkung. Über diesen Mechanismus der Interaktion von aPC mit PAR1 haben auch TM und EPCR antiinflammatorische Einflüsse, indem sie die von Thrombin abhängige Bereitstellung des aPC verstärken. Des Weiteren hat aPC über PAR1 regenerative



Fähigkeiten, diese beinhalten die Stimulation der Angiogenese, der Neurogenese sowie der Wundheilung (76, 77). Teilweise benötigt aPC neben EPCR und PAR1 noch weitere Rezeptoren, wie zum Beispiel PAR3, um die zytoprotektiven und regenerativen Effekte zu induzieren. Dies ist abhängig vom Zelltyp und Organ, auf dem die Rezeptoren lokalisiert sind. Eine Zeit lang wurden die zytoprotektiven Eigenschaften des aPC durch Gabe von rekombiniertem aPC bei hochgradig septischen Patienten ausgenutzt, aufgrund fraglicher Mortalitätsreduktion durch erhöhte Blutungsneigung dann aber wieder unterlassen (78). Neue Therapieoptionen diesbezüglich müssen in weiteren Studien erforscht werden.

### **2.2 Der Endotheliale Protein C Rezeptor als Marker für Stammzellen**

Die Interaktion von PAR1 mit Thrombin bzw. aPC stimuliert nicht nur intrazelluläre Signalwege in Endothelzellen, sondern nimmt unter anderem auch Einfluss auf Prozesse des Knochenmarks, genauer gesagt auf die dort lokalisierten hämatopoetischen Stammzellen (HSC). HSC sind in der Lage, sich selbst zu erneuern und in die verschiedenen Zellen des Blutes sowie in Endothelzellen zu differenzieren (79). In einer Studie von *A. Balazs et al.* wurde der Nachweis erbracht, dass einige wenige murine HSC im Knochenmark in großem Maße den Endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) exprimieren (80). Diese EPCR-positiven HSC weisen im Vergleich zu EPCR-negativen HSC ein deutlich höheres Differenzierungspotential auf. Daher wird EPCR als ein Marker angesehen, der mit der Aktivität der HSC des murinen Knochenmarks korreliert. *S. Gur-Cohen et al.* beschäftigten sich mit der Frage, welchen Einfluss EPCR auf die HSC hat (81). Auf der Oberfläche der EPCR-positiven HSC konnte ein weiterer Rezeptor nachgewiesen werden, der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1). Über PAR1 können Thrombin und an EPCR-gebundenes aPC Einfluss auf die Retention bzw. Mobilisierung von EPCR-positiven HSC aus dem Knochenmark nehmen. Die Interaktion zwischen aPC-EPCR-PAR1 führt zu einer verminderten NO Produktion und Expression von Rezeptoren für Stammzell-mobilisierende Faktoren, wodurch HSC vermehrt im Knochenmark zurückgehalten werden. Der Einfluss von zellulärem Stress, Entzündungsprozessen oder Zytokinen führt zu erhöhten Thrombin Spiegeln, wodurch es zu einer vermehrten NO Produktion, EPCR Abspaltung und Mobilisierung von HSC aus dem Knochenmark kommt.

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass EPCR nicht nur einen Marker für Stammzellen des hämatopoetischen Systems darstellt, sondern auch für murine Stammzellen der

Brustdrüse sowie des Endothels (82, 83). Die Generierung neuer Endothelzellen stellt eine wesentliche Grundlage in der Neubildung von Gefäßen dar, auf die im folgenden Abschnitt 2.3 näher eingegangen wird.

### **2.3 Prozesse der Gefäßneubildung**

Die Ausbildung von neuen Blutgefäßen stellt im Falle einer Unterbrechung der Blutversorgung nach Gefäßverletzung, -stenose oder -okklusion einen wichtigen Prozess des Körpers dar, um die Versorgung der betroffenen Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherzustellen und hypoxische Gewebeschäden und deren Folgen wie Zelltod und Fibrose zu vermeiden. Perizyten und Endothelzellen gehören zu den entscheidenden Zellen, die an der Neubildung von Gefäßen beteiligt sind, darüber hinaus spielen aber auch Blutplättchen und inflammatorische Zellen (insbesondere Monozyten) durch Sekretion angiogenetischer Botenstoffe eine unterstützende Rolle. Die Herkunft der Endothelzellen ist bis heute nicht vollständig geklärt und ist Bestandteil aktueller Forschung. Neben der Proliferation und Migration lokaler, ortsständiger Endothelzellen deuten frühere Studien auf das Vorhandensein frei im Blut zirkulierender sog. Endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark hin (84), aktuellere Studien bekräftigen die Annahme, dass es residente Stammzellen in der Gefäßwand gibt (83). In den folgenden Abschnitten werden die Prozesse Angiogenese, Arteriogenese und Vaskulogenese näher beschrieben.

#### **2.3.1 Angiogenese**

Die Angiogenese ist ein Mechanismus der Gefäßneubildung, der auf der Aussprossung bereits bestehender Gefäße infolge einer Gewebhypoxie beruht (85, 86). Hierbei interagieren verschiedene Zelltypen miteinander, unter anderem Endothelzellen, Perizyten und Immunzellen (15). Endothelzellen sind in der Lage, den Sauerstoffgehalt im Blut zu messen. Liegt ein Sauerstoffmangel vor, können über Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (HIFs, *Hypoxia-Inducible Transcription Factors*) angiogenetische Gene hochreguliert werden, wodurch unter anderem Endothelwachstumsfaktoren, wie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF; *Vascular Endothelial Growth Factors*) und Angiopoetin-2 oder die Stickstoffmonoxid-Synthase vermehrt exprimiert werden (1, 85, 87). Die Aussprossung neuer Blutgefäße beginnt mit der Vasodilatation vorhandener Gefäße in Folge der vermehrten

Stickstoffmonoxid-Freisetzung, gefolgt von einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität (87). Die Wachstumsfaktoren VEGF stellen eine Gruppe angiogenetischer Signalmoleküle dar, die an drei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR2/Flk-1/KDR, VEGFR-3/Flt-4) sowie an einen Neuropilin-1 Ko-Rezeptor auf der Oberfläche von Endothelzellen binden können (88). Dies führt zur Migration und Proliferation von Endothelzellen, was die Aussprossung neuer Blutgefäße ermöglicht (87). Dieselbe Wirkung zeigt Angiopoetin-2 durch Bindung an die Endothelzellenspezifische Tie2-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, allerdings nur in Anwesenheit von VEGF (89). In Abwesenheit von VEGF hat Angiopoetin-2 hingegen eine hemmende Wirkung auf den Prozess der Angiogenese, indem es Angiopoetin-1 am Tie2-Rezeptor antagonisiert, welches einen weiteren wichtigen angiogenetischen Faktor darstellt (90, 91). Die Einwanderung glatter Muskelzellen und weiterer, die Zellwand stabilisierender Zellen, bleibt im Prozess der Angiogenese aus (86).

Die Angiogenese stellt einen hoch komplizierten Prozess dar, auf den neben VEGF, Angiopoetin-1 und -2 zahlreiche weitere Proteine und Faktoren Einfluss nehmen, zu denen unter anderem der Gerinnungsfaktor Thrombin sowie Thrombomodulin (TM) gehören. Bereits 1997 wurde in einer Studie von *Haralabopoulos et al.* im Mausmodell die proangiogenetische Wirkung des Gerinnungsfaktors Thrombin beobachtet (92). Thrombin induziert durch Aktivierung von PAR1 eine Hochregulierung von VEGF und Angiopoetin-2, was folglich zu einer verstärkten Aussprossung von Gefäßen führt (88, 93, 94). Die Auswirkungen des TM können sowohl durch eine Verstärkung des proangiogenetischen aPC-Signalweges vermittelt werden als auch aPC-unabhängig sein, dann zeigen sich unterschiedliche Effekte, abhängig von den verschiedenen TM-Domänen. *Chung-Sheng Shi et al.* zeigten, dass rekombinantes TM, bestehend aus den sechs *Epidermal-Growth Factor (EGF)-like* Strukturen und der Serin/Threoninreichen Domäne (rTMD23), eine proangiogenetische Wirkung aufweist (43). In einer weiteren Studie von *Kuo et al.* wurde mittels verschiedener rTMD23 Proteine, welche so verändert waren, dass sie die aPC-Generierung nicht verstärken konnten, der Wirkmechanismus genauer betrachtet (95). rTMD23 interagiert mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (FGFR1), aktiviert diesen und stimuliert dadurch *in vitro* die Proliferation, Migration und Röhrenbildung von *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) und *in vivo* die Angiogenese. Ganz andere Ergebnisse zeigten sich in weiteren Studien in Hinblick auf die *lectin-like* Domäne des TM, welche durch die

Interaktion mit dem endothelialen Lewis Y Antigen dessen angiogenetische Effekte unterdrückt und somit hemmend auf die Angiogenese wirkt (96).

Eine weitere Form neben der aussprossenden Angiogenese stellt die intussuszeptive Angiogenese dar, bei der es durch longitudinale Aufspaltung eines Gefäßes zur Ausbildung eines vaskulären Netzwerkes kommt (97, 98). Die Angiogenese erfolgt nicht nur bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, sondern auch viele Pathologien, wie beispielsweise Tumorleiden und entzündliche Erkrankungen, machen sich dies zu Nutzen (1). Myokardinfarkt und Schlaganfall sind die typischen Erkrankungen, die durch unzureichende Angiogenese bei verminderter Gewebepfusion und somit ungenügender Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen entstehen.

### **2.3.2 Arteriogenese**

Abzugrenzen von der Angiogenese ist die Arteriogenese, bei welcher physikalische Kräfte (z.B. an Gefäßverengungen oder -verschlüssen) die Bildung von Kollateralarterien fördern (86). Liegt eine höhergradige Stenose oder ein Verschluss einer Arterie vor, entsteht eine erhöhte Strömungsgeschwindigkeit an der Engstelle und eine vermehrte Schubspannung am Gefäßendothel bereits präformierter Arteriolen, welche daraufhin zu funktionellen Kollateralarterien heranwachsen. Dabei kommt es durch den Einfluss von Monozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Perizyten zu Proliferations- und Umbauprozessen (99), welche zu einer Größenzunahme des Gefäßlumens sowie der Gefäßwand führen (100). Die Arteriogenese stellt sich als selbstlimitierenden Prozess dar, da es zu einem Abfall der Schubspannung in den präformierten Arteriolen kommt, sobald ausreichend viele Kollateralarterien gebildet sind (101).

### **2.3.3 Vaskulogenese**

Ein weiterer wichtiger Prozess in der Neubildung von Gefäßen ist die Vaskulogenese, ein Vorgang in der Embryonalentwicklung, bei dem Endothelzellen und Blutgefäße, aus Endothelialen Progenitorzellen (EPC), neu gebildet werden (102, 103). Diese Zellen sind mesodermalen Ursprungs und stammen von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) des Knochenmarks ab. Unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter VEGF, differenzieren die EPC zu Endothelzellen,

welche das entstehende Gefäßsystem auskleiden (102). EPC sowie hämatopoetische Stammzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Proteine, zu denen unter anderem der VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1), der Angiopoetin-Rezeptor Tie-2, c-Kit, Sca-1 sowie die Antigene CD34 und CD133 gehören (104, 105). Die Annahme, dass sich die Vaskulogenese ausschließlich auf die Embryonalentwicklung beschränkt, konnte 1997 durch eine Studie von *Asahara et al.* widerlegt werden (84). In der Studie wurde gezeigt, dass es im adulten Organismus frei im Blut zirkulierende CD34 und Flk-1 positive EPCs gibt. Unter dem Einfluss von VEGF stammen diese Zellen von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab, differenzieren zu Endothelzellen und tragen somit zur Neubildung von Gefäßen bei (104, 106). Dieser Vorgang wird als postnatale Vaskulogenese bezeichnet. EPC sind nicht die einzigen Zellen, die zur Differenzierung in neue Endothelzellen befähigt sind, beispielsweise sind myeloide Vorläuferzellen oder mesenchymale Stammzellen dazu auch in der Lage (107).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionelle Bedeutung von EPCR für die post-ischämische Gefäßneubildung zu untersuchen. Dafür wurden genetisch modifizierte Mauslinien und das experimentelle Modell der einseitigen Hinterlaufischämie verwendet, gefolgt von funktionellen Analysen der Wiederherstellung der Gewebepfusion und histologischen und immunhistochemischen Analysen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Name	Firma	Bestellnummer
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1582, 2500
Agarose, <i>Broad Range</i>	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	Z846.3
Albuminfraktion V (Bovines Rinderserum, BSA)	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	2834
D (+)-Saccharose	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	4621.1
DAPI (4',6-Diamidino-2- phenylindol)	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	D9542-1MG
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt	1.07961.0100
Essigsäure 100 %	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	3738.4
Ethanol >99,8 %, vergällt	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	K9284
<i>Fluorescence Mounting Medium</i>	Dako North America, Inc., CA, USA	S3023
Natronlauge 2 M (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt	182158.1211
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim	158127
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 (10x)</i>	Gibco® by Life Technologies ™, Carlsberg, CA, USA	70011-051
Pikrinsäure, gesättigt	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim	P6744-1GA
Roticlear	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	A538.5

## Material und Methoden

Siriusrot	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim	365548-5G
Triton-X 100	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	3051.3

*Tabelle 1: Chemikalien*

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
Deckglas Pinzette gebogen 115 mm	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe	K718.1
Deckgläser 24x60 mm (Menzel)	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig	BB022060A1
Einmal-Wägeschalen 14x14 mm	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe	2159.2
Entsorgungsbeutel	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe	E706.1
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg	1003-8760
Eppendorf Safe- LockTubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg	H177868L
Falcon 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	188271
Falcon 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	227261
Glasküvetten mit Deckel	VWR International, Radnor, PA, USA	631-9328
Halter für Eppendorf- Reaktionsgefäße	VWR International, Radnor, PA, USA	211-0209
Halter für Falcons 15 ml und 50 ml	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe	PC55.1
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA	H-4000

## Material und Methoden

Inkubationsschale	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	4812.1
Laborflasche 250 ml	VWR International, Radnor, PA, USA	215-1535
Laborflaschen 1000 ml	VWR International, Radnor, PA, USA	215-1537
Laborflaschen 500 ml	VWR International, Radnor, PA, USA	215-1536
Messzylinder 100 ml	VITLAB GmbH, Großostheim	612-4065
Messzylinder Kartell 1000 ml	VWR International, Radnor, PA, USA	612-4066
Messzylinder Kartell 500 ml	VWR International, Radnor, PA, USA	612-4063
Nitril NextGen Handschuhe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	1283M
Objektträger Superfrost ultra	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig	J3800AMNZ
Objektträgerkasten	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe	K532.1
Objektträgermappe	VWR International, Radnor, PA, USA	631-0689
PCR SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH	710908
Pinzette (10 cm, gerade)	Fine Science Tools® GmbH, Heidelberg	11150-10
Pipette Eppendorf Research plus 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123-000.020
Pipette Eppendorf Research plus 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123-000.047
Pipette Eppendorf Research plus 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3123-000.063



## Material und Methoden

Pipettenspitzen 0,1-10 µl	Starlab International GmbH, Hamburg	S1110-3000
Pipettenspitzen 100 µl	Starlab International GmbH, Hamburg	S1111-0006
Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab International GmbH, Hamburg	S1111-6001

*Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien*

### 3.1.3 Geräte

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Inkubator Heratherm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, MA, USA
Kryotom Leica CM3050S	Leica Biosystems Inc., Concord Ontario, CAN
Kühlschränke	Liebherr-International AG, Bulle, CH
Laser Doppler Perfusion Imaging PeriScan PIM 3	Perimed AB, Järfälla, SWE
Mikroskop LSM 710 Confocal	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Olympus BX51	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet 3	Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage Sartorius MC1 AC 210S	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen
Schwenktisch Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waage Sartorius MC1 LC 2200 P	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen

## Material und Methoden

---

Wasseraufbereitungsanlage PureLab Ultra	Elga LabWater by Veolia Water Technologies, Celle
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg

---

*Tabelle 3: Geräte*

### 3.1.4 Software

<b>Name</b>	<b>Firma</b>
Graph Pad Prism 9.0.1	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Image-Pro Plus 7.0	Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, US
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

---

*Tabelle 4: Software*

### 3.1.5 Antikörper

#### 3.1.5.1 Primärantikörper

Name	Marker	Firma	Bestellnummer	Herkunft	Reaktivität	Verdünnung	Permeabilisierung
Carboanhydrase IX	Hypoxie	R&D Systems	AF2344	goat, polyklonal	anti-mouse	1:100 in PBS (1x)	0,05 % Triton-X 100
CD31 (PECAM) (clone MEC 13.3)	(Frühe & reife) Endothelzellen	SantaCruz Biotechnology	sc-18916	rat, monoklonal	anti-mouse/human	1:50 in PBS (1x)	0,05 % Triton-X 100
CD31 (PECAM) (clone SZ31)	(Frühe & reife) Endothelzellen	Dianova	DIA-310	rat, monoklonal	anti-mouse	1:50 in PBS (1x)	-
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor	SantaCruz Biotechnology	sc-23575	goat, polyklonal	anti-mouse/ human/rat	1:50 in PBS (1x)	-
Mac2 (clone M3/38)	Makrophagen	Cedarlane Labs	CL8942AP	rat, monoklonal	anti- mouse/human	1:1.000 in AB- Diluent (1x)	-
p53	Apoptose	Abcam	ab131442	rabbit, polyklonal	anti- mouse/human/rat	1:100 in PBS (1x)	0,05 % Triton-X 100
PDGFR-beta (clone Y92)	Mesenchymale Zellen	Abcam	ab32570	rabbit, monoklonal	anti-mouse/ human/rat	1:100 in PBS (1x)	0,05 % Triton-X 100

## Material und Methoden

Proliferating Cell Nuclear Antigen (clone EPR3821)	Proliferation	Abcam	ab92552	rabbit, monoklonal	anti-mouse/human/rat	1:100 in PBS (1x)	0,1 % Triton-X 100
Rhodamine Wheat Germ Agglutinin	Myozyten Zellmembran	Vector BioLabs	R2-1022	-	anti-mouse/human	1:200 in PBS/ 1 mM CaCl <sub>2</sub>	-
Smooth Muscle alpha-Actin (clone 1A4)	glatte Muskelzellen	Sigma-Aldrich	A2547	mouse, monoklonal	anti-mouse/human	1:50 in PBS (1x)	0,05 % Triton-X 100

*Tabelle 5: Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen*

**3.1.5.2 Sekundärantikörper**

<b>Name</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
Donkey anti-rat 555	1:500	Abcam	Ab150154
Goat anti-rabbit 488	1:500	MoBiTec	MFP-A1008
Goat anti-mouse 488	1:500	MoBiTec	MFP-A1029
Donkey anti-goat 488	1:500	MoBiTec	MFP-A1055
Donkey anti-rat 555	1:500	Abcam	Ab150154
Donkey anti-rabbit 546	1:500	Molecular Probes	A10040
FITC Donkey anti- rat 488	1:500	Thermo Fischer Scientific	Novex A18746
LEL Lectin (Lycopersicum Esculentum Lectin)	1:250	Vector BioLabs	TL-1176

*Tabelle 6: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen*

### 3.1.6 Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen

Für die Herstellung sämtlicher Lösungen wurde entmineralisiertes, doppelt destilliertes Wasser verwendet, welches über die Wasseraufbereitungsanlage *PureLab Ultra* der Firma *ELGA* aufbereitet wurde. Im Folgenden wird dieses Wasser mit ddH<sub>2</sub>O abgekürzt.

#### 3.1.6.1 Lösungen für die Gewebeverarbeitung

Lösung	Reagenz	Menge
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 (1x)</b>	PBS pH 7,4 (10x)	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O	900 ml
<b>4 % Paraformaldehyd (PFA)</b>	Paraformaldehyd	4 g
	PBS (1x)	100 ml
	2 M NaOH	30 µl
<b>15 % Sucrose-Lösung</b>	D (+)-Saccharose	15 g
	PBS (1x)	100 ml
<b>30 % Sucrose-Lösung</b>	D (+)-Saccharose	30 g
	PBS (1x)	100 ml

*Tabelle 7: Lösungen für die Gewebeverarbeitung*

#### 3.1.6.2 Lösungen für histologische Färbungen

Lösung	Reagenz	Menge
<b>1 % Picrosiriusrot-Lösung</b>	Siriusrot	1 g
	gesättigte Pikrinsäure	100 ml
<b>30 % Essigsäure</b>	100 % Essigsäure	120 ml
	ddH <sub>2</sub> O	280 ml

*Tabelle 8: Lösungen für histologische Färbungen*

**3.1.6.3 Lösungen für Immunfluoreszenzfärbungen**

<b>Lösung</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 (1x)</b>	PBS pH 7,4 (10x)	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O	900 ml
<b>0,05 %iger Triton-X100-Puffer</b>	Triton-X100	250 µl
	PBS pH 7,4 (1x)	auf 500 ml
<b>0,1 %iger Triton-X100-Puffer</b>	Triton-X100	500 µl
	PBS pH 7,4 (1x)	auf 500 ml
<b>DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)</b>	DAPI (Stammlösung)	1 µl
<b>Gebrauchslösung (1:5000 verdünnt)</b>	PBS pH 7,4 (1x)	4999 µl
<b>0,1 % BSA (Bovines Serumalbumin)</b>	BSA	1 g
	PBS pH 7,4 (1x)	100 ml

*Tabelle 9: Lösungen für Immunfluoreszenzfärbungen*

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden Mäuse aus drei verschiedenen genetisch veränderten Mauslinien eingesetzt:  $TM^{Pro/Pro}$ ,  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre$  und  $PAR1^{-/-}$ . Eine genaue Charakterisierung der Mausstämme kann den folgenden Abschnitten entnommen werden. Die Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie wurde ausschließlich bei männlichen Tieren im Alter von 12-14 Wochen durchgeführt. Anschließend erfolgte die Entnahme und Anfertigung von Gefrierschnitten des *M. gastrocnemius*. Die Anzahl (n) der eingesetzten Tiere kann den jeweiligen Abschnitten im Ergebnisteil entnommen werden.

Alle für diese Arbeit durchgeführten Tierversuche mit der Tierversuchsnummer G-16-1-049 erfolgten im Einklang mit ethischen Richtlinien und dem geltenden Tierschutzgesetz.

Alle Tiere waren während des gesamten Versuchszeitraums in der Experimentierhaltung des *Translational Animal Research Center* der Universität Mainz untergebracht. Dort lebten sie unter konventioneller Barrierehaltung in 265x205x140mm großen Kunststoffkäfigen der Firma *Zoonlab*. Ein Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch eine Lichtphase zwischen 6 und 18 Uhr und eine Dunkelphase zwischen 18 und 6 Uhr gewährt. Eine konstante Raumtemperatur zwischen 20°C und 24°C wurde ebenfalls sichergestellt. Als Futtermittel diente pelletiertes Zucht- bzw. Haltungsfutter der Firma *Ssniff*.

### 3.2.2 Charakterisierung der verschiedenen Mausstämme

#### 3.2.2.1 Charakterisierung des Mausstamms $TM^{Pro/Pro}$

$TM^{Pro/Pro}$  Mäuse tragen eine Punktmutation im Thrombomodulin (TM) Gen (108), welche sich in der *interdomain loop* zwischen den EGF-Einheiten 4 und 5 befindet. Es handelt sich dabei um den Austausch von Glutaminsäure (Glu) gegen Prolin an der Aminosäureposition 404. Folge der Punktmutation im TM Gen ist eine eingeschränkte Aktivierung von Protein C sowie eine reduzierte Hemmung des Gerinnungsfaktors Thrombin (109). Für die Versuche dieser Arbeit wurden  $TM^{Pro/Pro}$  Mauslinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund verwendet. Von ... erhielten wir eine Mauslinie mit gemischtem (129/SvPas-C57BL/6) genetischen Hintergrund und brauner Fellfarbe. ... stellte uns  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse mit einem reinen C57BL/6J oder



C57BL/6N genetischen Hintergrund zur Verfügung. Diese Mäuse zeigten eine schwarze Fellfarbe. Die Änderung der Fellfarbe in Abhängigkeit zum genetischen Hintergrund beruht auf der engen Nachbarschaft des Thrombomodulin Locus zum Agouti Locus, welcher die Information für die Fellzeichnung trägt (110). Als Kontrollgruppen dienten uns jeweils  $TM^{WT/WT}$  Mäuse mit dem jeweilig gleichen genetischen Hintergrund, welche Wurfgeschwister waren und keine Mutation im TM Gen aufwiesen.

### 3.2.2.2 Charakterisierung des Mausstamms $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre$

Die Mauslinie  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre$  stammte von ... .  $EPCR^{fl/fl}$  Mäuse wurden hierfür mit der  $Tie2.Cre$ -Rekombinase (Jackson Laboratories; B6.Cg-Tg(Tek-cre)12Flv/J; #004128) gekreuzt. Die  $Tie2.Cre$ -Rekombinase schneidet das  $EPCR^{flox}$  Allel aus, wodurch es zu einer Deletion des Endothelialen Protein C Rezeptors (EPCR) auf  $Tie2.Cre$  exprimierenden Zellen (vor allem Endothelzellen, aber auch hämatopoetische Zellen) kommt (111). Aufgrund der konstanten Aktivität der  $Tie2.Cre$ -Rekombinase kann nicht ausgeschlossen werden, dass EPCR auch in myeloischen und hämatopoetischen Zellen deletiert wird. Um dies näher untersuchen zu können, stellte uns ... zusätzlich die Mauslinie  $EPCR^{fl/fl}LysM.Cre^+$  zur Verfügung. Hierfür wurden  $EPCR^{fl/fl}$  Mäuse mit der  $LysM.Cre$ -Rekombinase gekreuzt, welche im Gegensatz zur  $Tie2.Cre$ -Rekombinase ausschließlich in myeloischen Zellen aktiv ist. Als Kontrollgruppe für  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  bzw.  $EPCR^{fl/fl}LysM.Cre^+$  Mäuse standen uns  $EPCR^{fl/fl}$  Mäuse zur Verfügung, die den gleichen genetischen C57BL/6N Hintergrund hatten, aber keine  $Tie2.Cre$ - bzw.  $LysM.Cre$ -Rekombinase Aktivität aufwiesen.

### 3.2.2.3 Charakterisierung des Mausstamms PAR1<sup>-/-</sup>

Die Mauslinie PAR1<sup>-/-</sup> wurde uns von ... zur Verfügung gestellt. Durch eine Punktmutation im Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) Gen ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor PAR1 nicht mehr in der Lage, intrazelluläre Signalwege zu stimulieren (112). Bindet aktiviertes Protein C (aPC) an PAR1, führt dies zu zellprotektiven Veränderungen, wohingegen die Bindung von Thrombin an PAR1 entzündungsfördernde Prozesse vermittelt (72). PAR1<sup>-/-</sup> Mäuse wurden aus F2<sup>tm1aWtsi</sup> (ES#HEPD0904\_4\_C05; EUCOMM) Mäusen durch Kreuzung mit einem *general flippase-deleter* gefolgt von einer *pan cre-deleter* Linie erzeugt. Alle Nachkommen wurden nach der Expression des *nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (nnt) Gens sortiert. Das nnt Gen ist bei C57BL/6J Mäusen nicht vorhanden, bei C57BL/6N Mäusen hingegen schon. Somit konnte sichergestellt werden, dass die Mäuse der beiden Gruppen jeweils den gleichen genetischen Hintergrund tragen. Die Punktmutation im PAR1 Gen kann an zwei verschiedenen Stellen vorliegen, entweder bei R46Q (Arg46Gln) oder bei R41Q (Arg41Gln). Die somit entstandenen Mauslinien werden als PAR1 R46Q und PAR1 R41Q bezeichnet und weisen beide den C57BL/6N genetischen Hintergrund auf (113). Die Punktmutationen haben großen Einfluss auf die Aktivierung des PAR1 durch aPC oder Thrombin. Bindet aPC an PAR1, werden die zytprotektiven Mechanismen durch eine Spaltung des PAR1 bevorzugt an Stelle R46 ausgelöst (72). Bei mutierten PAR1 R46Q Mäusen ist dies nicht mehr möglich. Bindet Thrombin an PAR1, werden die entzündungsfördernden Prozesse durch Spaltung des PAR1 ausschließlich an Stelle R41 ausgelöst (72). Bei mutierten PAR1 R41Q Mäusen kann dieser Prozess nicht mehr ausgelöst werden.

### 3.2.3 Genotypisierung der $TM^{Pro/Pro}$ Mäuse

Die Mauslinie  $TM^{Pro/Pro}$  wurde, je nach Vorhandensein des mutierten Gens auf nur einem, beiden oder keinem Allel in drei Gruppen unterschieden –  $TM^{Pro/Pro}$  homozygote,  $TM^{WT/Pro}$  heterozygote und  $TM^{WT/WT}$  Wildtyp Mäuse. Anhand äußerlicher Merkmale lassen sich die Tiere der unterschiedlichen Genotypen nicht unterscheiden, zudem handelt es sich um Wurfgeschwister. Daher musste jede Maus, anhand einer Biopsie ihres Mausschwanzes, einer Genotypisierung unterzogen werden, um sie dem entsprechenden Genotyp zuordnen zu können. Die Mauslinie  $TM^{Pro/Pro}$  war zu Beginn dieser Arbeit bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert und die Genotypisierung wurde von ... bzw. der Arbeitsgruppe von ... durchgeführt. Eine Genotypisierung besteht aus mehreren Schritten, die im Folgenden kurz erläutert werden. Die Genotypisierungen der Mauslinien  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre$  und  $PAR1^{-/-}$  wurden ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von ... durchgeführt.

Um eine Genotypisierung durchführen zu können, wird genomische DNA benötigt, welche durch Lyse der Biopsie des Mausschwanzes gewonnen wird. Nach ausreichender Inkubationszeit (über Nacht) in einem Lyse-Reagenz erfolgt im Anschluss eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um die gewonnene DNA amplifizieren zu können. Eine PCR besteht aus sich in vielen Zyklen wiederholenden Schritten – Denaturierung der Doppelstränge, Annealing spezifischer Primer und Elongation der Sequenzen. Die für die Genotypisierung der  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse eingesetzten Primer waren folgende:

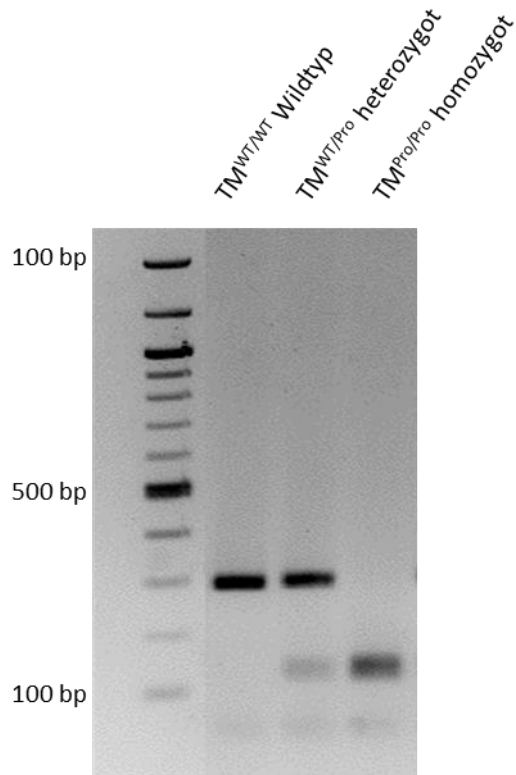
$TM^{Pro/Pro}$  for            ATG GAG AGT GCG TGG AGC TTC TTG A

$TM^{Pro/Pro}$  rev            GAT ACA CTC ATA GGA GCC AGG GAA G

Im weiteren Verlauf wird eine Aufreinigung und ein Restriktionsverdau der gewonnenen PCR-Produkte durchgeführt. Der Restriktionsverdau ist entscheidend, um in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese die charakteristischen Banden der  $TM^{Pro/Pro}$  Genotypen erkennen zu können. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf einer Größenauftrennung der einzelnen DNA-Fragmente. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an das Agarose Gel wandern die DNA-Fragmente der zu trennenden Probe aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode und werden ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch den Vergleich mit einem bekannten DNA-Größenstandard kann im Anschluss eine Identifikation und Zuordnung der DNA-Fragmente zu den drei verschiedenen  $TM^{Pro/Pro}$  Genotypen erfolgen.

## Material und Methoden

In **Abbildung 2** sind die Ergebnisse der Genotypisierung der  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse dargestellt.  $TM^{WT/WT}$  Wildtyp Mäuse zeigen eine charakteristische Bande bei 320 bp (Basenpaaren),  $TM^{WT/Pro}$  heterozygote Mäuse drei Banden bei 320 bp, 168 bp und 152 bp. Mäuse die dem Genotyp  $TM^{Pro/Pro}$  homozygot zugeordnet werden können zeigen zwei Banden, bei 168 bp und 152 bp.



**Abbildung 2: Ergebnis der Genotypisierung der Mauslinie  $TM^{Pro/Pro}$**

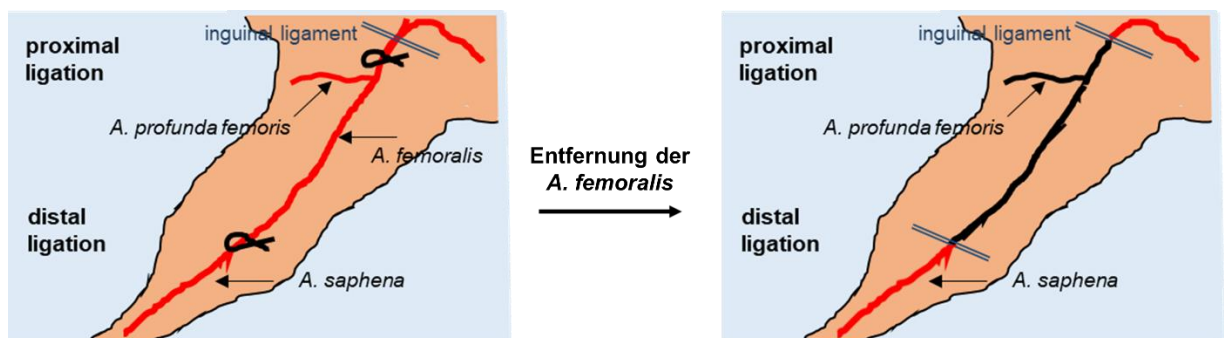
*bp=Basenpaare; Bei  $TM^{WT/WT}$  Wildtyp Mäusen zeichnet sich charakteristisch eine Bande bei 320 bp ab, bei  $TM^{WT/Pro}$  heterozygoten Mäusen drei Banden bei 320 bp, 168 bp und 152 bp, bei  $TM^{Pro/Pro}$  homozygoten Mäusen zwei Banden bei 168 bp und 152 bp (aufgrund des geringen Unterschiedes lassen sich die beiden Banden 168 bp und 152 bp visuell kaum getrennt voneinander darstellen).*

### 3.2.4 Maus-Modell zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie

Die operative Unterbindung und nachfolgende Entfernung der *A. femoralis* führt proximal der Ligatur zur Arteriogenese von kleinen, bereits bestehenden Kollateralen in funktionelle, leitende Gefäße sowie zur distalen Angiogenese in der ischämischen Muskulatur (100). Die einseitige Hinterlauf-Ischämie wurde bei Mäusen im Alter von 12-14 Wochen induziert. Dabei orientierten wir uns am Vorgehen von *Limbourg et al.* (100). Durch kleine Veränderungen stellten wir sicher, dass die Anzahl von Kollateralen so gering wie möglich gehalten wurde, um den Focus auf die Angiogenese legen zu können. Die Ligatur der *A. femoralis* wurde stets am rechten Hinterlauf der Mäuse durchgeführt, der linke Hinterlauf blieb unverändert und diente als nicht-ischämischer Vergleich. Xylazin-/Ketaminhydrochlorid in Form einer intraperitonealen Injektion wurde zur präoperativen Anästhesie genutzt (114). Wie in **Abbildung 3** dargestellt ist, wurde zunächst die rechte *A. saphena* ligiert und danach die rechte *A. femoralis* distal des *Ligamentum inguinale* und proximal des Abgangs der *A. profunda femoris* unterbunden.

Anschließend wurde der Abschnitt zwischen beiden Ligaturen entfernt. In unserem Versuch wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet, um den Einfluss des Östrogenzyklus auf die Wiederherstellung des Blutflusses zu verhindern (115).

Die Operationen wurden von ... und ... durchgeführt.

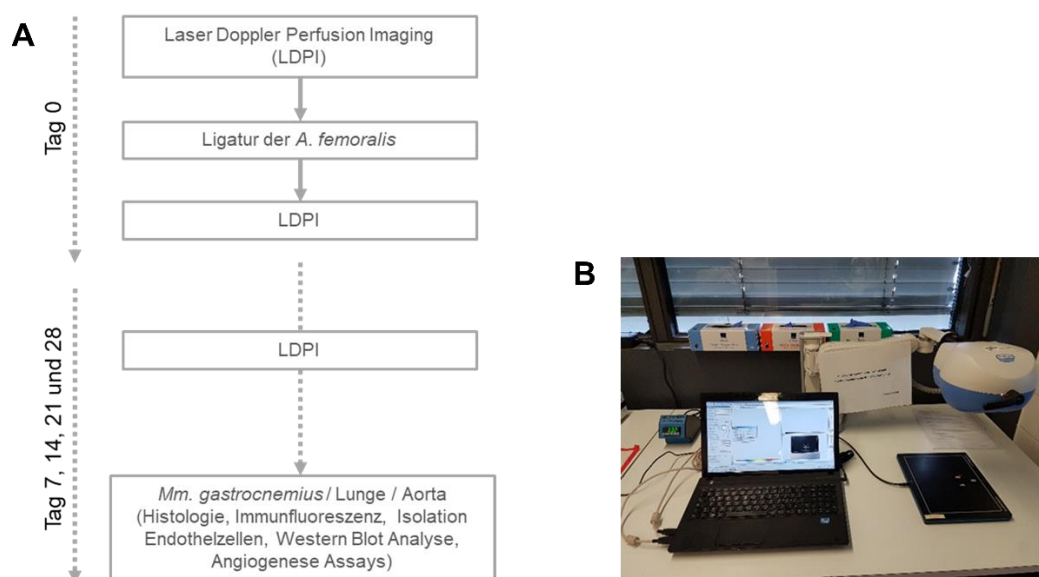


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Operationsmethode zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie**

Gezeigt sind die Lokalisationen, an denen eine Ligatur der arteriellen Gefäße des rechten Hinterlaufs der Mäuse vollzogen wurde. Zunächst wurde die rechte *A. saphena* ligiert und danach die rechte *A. femoralis* distal des *Ligamentum inguinale* und proximal des Abgangs der *A. profunda femoris* unterbunden. Im Anschluss wurde der dazwischenliegende Gefäßabschnitt vollständig durch Zug entfernt. Auf diese Weise sollte die Herstellung von Umgehungskreisläufen vermindert werden (116).

### 3.2.5 Laser Doppler Perfusion Imaging

Wie in **Abbildung 4A** dargestellt ist, wurde direkt vor und nach der Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie sowie im weiteren Verlauf postoperativ an den Tagen 7, 14, 21 und 28 mittels der *Laser Doppler Perfusion Imaging* (LDPI) Methode die Durchblutung in jeweils beiden Hinterläufen der Mäuse gemessen. Bei diesem nicht-invasiven Verfahren wurden die Mäuse mit Isofluran (1,5-2 %) sediert und auf eine 37°C warme Platte gelegt. Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 4B** gezeigt. Der Blutfluss wurde als Mittelwert aus drei Aufnahmen in der *area of interest* als Prozentangabe im Vergleich zum kontralateralen, nicht-ischämischen Hinterlauf angegeben. Im Anschluss an die LDPI Messung wurden die Mäuse nach 28 Tagen getötet und deren *M. gastrocnemius* beidseits, sowie die Lunge (zur Isolation von Endothelzellen) und die Aorta (zur Analyse der Gefäßausprossung *in vitro*) entnommen.



**Abbildung 4: Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) Methode**

**(A)** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie. Vor und nach der Ligatur der *A. femoralis* und der *A. saphena* wurde mittels der LDPI Messung die Perfusion der rechten und linken Hinterläufe der Mäuse ermittelt. Im weiteren Verlauf wurde an den Tagen 7, 14, 21 und 28 ebenfalls eine LDPI Untersuchung durchgeführt. Im Anschluss wurden die Mäuse getötet und deren *M. gastrocnemius*, Lunge und Aorta entnommen. **(B)** Versuchsaufbau im Labor mit Wärmeplatte zur Messung der Durchblutung in den Hinterläufen der Mäuse.

### 3.2.6 Gewebepräparation und -verarbeitung

Vier Wochen nach der Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie wurden die Mäuse getötet, jeweils deren rechter und linker *M. gastrocnemius* entnommen und das gewonnene Material in 4 %, frisch angesetztes PFA überführt, wo es unter ständiger Durchmischung auf dem Schwenktisch *Duomax 1030* für ca. 2 Stunden inkubierte. Im Anschluss wurde das Gewebe nach Entfernung des PFA dreimal in 1 x PBS gewaschen. Als nächster Schritt folgte die Inkubation der Muskulatur in 15 % Sucrose-Lösung bei 4 °C im Kühlschrank auf dem Schwenktisch *Duomax 1030* über Nacht. Am Folgetag wurde das Gewebe in 30 % Sucrose-Lösung überführt, worin es ebenfalls bei 4 °C im Kühlschrank auf dem Schwenktisch *Duomax 1030* für weitere 24 h inkubierte. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Einbettung des Gewebes in *Tissue Tek*® und anschließend die Lagerung bei -80°C. Die Gewebeschnitte wurden mit einer Dicke von 5-7 µm mit dem Kryotom *Leica CM3050S* angefertigt und auf *Superfrost Ultra Plus* Objektträger aufgezogen. Pro Maus wurden vier Gewebeschnitte auf einem Objektträger fixiert, zwei des ischämischen rechten Hinterlaufs, zwei des nicht-ischämischen linken Hinterlaufs. Von jeder Maus wurden mehrere Objektträger angefertigt. Die Gewebepräparation und -verarbeitung wurde von ... durchgeführt.

Bis zum Zeitpunkt der Färbungen wurden die Schnitte bei -80°C aufbewahrt.

Die Zusammensetzung der Lösungen für die Gewebeverarbeitung kann Tabelle 7 entnommen werden.

### 3.2.7 Histologische Färbungen

#### 3.2.7.1 Siriusrot-Färbung

Als histologische Übersichtsfärbung wurde die Siriusrot-Färbung zum Nachweis von interstitiellem Kollagen angewandt. Unter einem Polarisationsmikroskop stellen sich Kollagenfasern, je nach Alter, grün/gelb/rot leuchtend dar. Die detaillierten Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Durchführung:

- 5 min auftauen der Gewebeschnitte
- 5 min nachfixieren in Aceton bei -20°C
- 5 min trocknen unter dem Abzug
- 5 min wässern in ddH<sub>2</sub>O
- 60 min färben in 1 % Picrosiriusrot-Lösung
- Überschüssige Färbung auf ein Tuch abtropfen
- 2 x 1 min spülen in 30 % Essigsäure
- Kurz spülen in ddH<sub>2</sub>O
- 3 x 3 min entwässern in 100 % Ethanol
- 2 x 5 min wässern in *RotiClear*
- Eindecken mit *Entellan*

#### 3.2.8 Immunfluoreszenzfärbungen

Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung ist es möglich, bestimmte Epitope (molekulare Strukturen eines Antigens) in Geweben nachzuweisen. Dabei kommen ein primärer sowie ein sekundärer Antikörper zum Einsatz. Der primäre Antikörper bindet mit hoher Affinität und Spezifität an ein bestimmtes Epitop. Nach ausreichender Inkubationszeit erfolgt die Zugabe eines Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpers, welcher sich gegen den primären Antikörper richtet und diesen somit bindet. Bei Anregung einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert das Fluorochrom, dies lässt sich dann mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysieren.

In dieser Arbeit wurden Immunfluoreszenzfärbungen zur Darstellung verschiedener Zelltypen und Rezeptoren in Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius* der Mäusen genutzt. Folgende Komponenten waren dabei von Bedeutung: *Cluster of Differentiation 31* (Endothelzell-Marker, CD31 oder PECAM-1), Endothelialer Protein C Rezeptor (EPCR), Tumorprotein 53 (Apoptose-Marker, p53), *Platelet-Derived*



*Growth Factor Receptor beta* (mesenchymaler Marker, PDGFR $\beta$ ), *Smooth Muscle Actin* (mesenchymaler Marker, SMA), *Wheat Germ Agglutinin* (Myozyten Membran Marker, WGA), Mac2 Antigen (Makrophagen Marker, Mac2), *Lycopersicum Esculentum Lectin* (Blutgefäß Marker, LEL), *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Proliferationsmarker, PCNA), Carboanhydrase IX (Hypoxie Marker). Zu Darstellung der Zellkerne wurde stets die DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Gebrauchslösung verwendet, siehe Tabelle 9. Die Eigenschaften der eingesetzten primären Antikörper kann Tabelle 5 im Abschnitt 3.1.5. entnommen werden. Im gleichen Abschnitt in Tabelle 6 sind die sekundären Antikörper aufgelistet.

Um eine hohe Spezifität gewährleisten zu können, wurden die Färbungen im Vorfeld mit unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen auf Kontrollgewebe mit einer hohen Konzentration des entsprechenden Epitops durchgeführt. Die dadurch erlangten optimalen Konzentrationen der Antikörper erlauben ein ausgezeichnetes Signal-Hintergrund-Verhältnis. Zur Sicherung der Qualität wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher anstelle des Primärantikörpers lediglich das Verdünnungsmittel aufgetragen wurde.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen folgten weitestgehend einem Standardprotokoll, welches in 3.2.8.1 aufgeführt ist.

### 3.2.8.1 Standardprotokoll

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden manuell durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die einzelnen Schritte bei Raumtemperatur ausgeführt. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen kann Tabelle 9 entnommen werden. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 5 und 6 zusammengestellt.

#### Tag 1:

- 5 min auftauen der Gewebeschnitte
- 5 min wässern in 1 x PBS
- 10 min Fixierung in Aceton bei -20°C (Gefrierfach)
- 5 min trocknen unter dem Abzug
- 5 min wässern in 1 x PBS
- 10 min Permeabilisierung in 0,05 % Triton-X in 1 x PBS bei 37°C (Brutschrank)
- 3 x 5 min Spülen in 1 x PBS
- Einzirkeln der einzelnen Gewebeschnitte mithilfe des *ImmEdge Pen*
- Inkubation des 1. Antikörpers bei 4°C (Kühlschrank) über Nacht

#### Tag 2:

- 3 x 5 min waschen in 1 x PBS
- Inkubation des 2. Antikörpers lichtgeschützt für 60 min einschließlich Kernfärbung mit DAPI (1:5.000)
- 3 x 5 min waschen in 1 x PBS
- 2 min spülen in ddH<sub>2</sub>O
- Eindecken auf Objektträger mit *Fluorescence Mounting Medium*

## Material und Methoden

---

Im Folgenden soll auf Abweichungen vom Standardprotokoll eingegangen werden, die bei manchen Immunfluoreszenzfärbungen aufgetreten sind.

<b>Immunfluoreszenzfärbung</b>	<b>Abweichung vom Standardprotokoll</b>
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Die ersten Schritte wurden durchgeführt wie im Standardprotokoll beschrieben</li><li>• Es wurde keine Permeabilisierung in Triton-X durchgeführt</li><li>• Nach dem Einzirkeln des Gewebes erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit WGA</li><li>• Direkt im Anschluss die Kernfärbung mit DAPI 1:1.000 für 15 min</li><li>• Anschließend wurden die Gewebeschnitte wie im Standardprotokoll beschrieben in 1 x PBS gewaschen, in ddH<sub>2</sub>O gespült und eingedeckt</li></ul>
Mac2 Antigen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Es wurde keine Permeabilisierung in Triton-X durchgeführt</li><li>• Alle anderen Schritte wurde wie im Standardprotokoll beschrieben durchgeführt</li></ul>
Tumorprotein p53	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nach dem Einzirkeln der Gewebeschnitte erfolgte eine Blockierung in 1 % BSA in 1 x PBS für 45 min</li><li>• Danach wurde der erste AK inkubiert und die weiteren Schritte wie im Standardprotokoll beschrieben durchgeführt</li></ul>
Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Die Permeabilisierung erfolgte in 0,1 % Triton-X in 1x PBS</li></ul>

*Tabelle 10: Abweichungen vom Standardprotokoll für Immunfluoreszenzfärbungen*

### **3.2.9 Isolation primärer muriner pulmonaler Endothelzellen**

Im folgenden Abschnitt wird die Methode der Isolation primärer muriner pulmonaler Endothelzellen beschrieben, welche von ... durchgeführt wurde. Für die Isolation von primären murinen pulmonalen Endothelzellen wurden die Mäuse getötet, ihre Lungen entnommen, in sterilem 1 x PBS mit 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen und anschließend in 1 mm große Stücke geschnitten. Im nächsten Schritt wurden die Gewebefragmente in einem Puffer, bestehende aus 1 x PBS und 1,5 mg/ml Collagenase A, für 30 min bei 37 °C inkubiert und alle 10 min durchmischt. Im Anschluss wurde das im Puffer enthaltene Gewebe mit dem Stempel einer sterilen Spritze durch ein 70 µm Falcon Zellsieb gedrückt. Das *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM; Gibco #31966021), bestehend aus 20 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco), wurde verwendet, um die Reaktion zu stoppen. Nach Zentrifugation der Lösung wurde das Zellpellet in einer Lösung bestehend aus 0,5 % Rinderserum und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure in 1x PBS resuspendiert. Die Endothelzellen wurden mit CD31 konjugierten MicroBeads (Miltenyi Biotec; # 130-097-418) markiert und anschließend durch LS Säulen (Miltenyi Biotec #130-042-401) getrennt. Auf mit 0,2 % Gelatine (Sigma) beschichteten Petrischalen wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im *Endothelial Cell Growth Medium MV2 Kit* (PromoCell) kultiviert. Alle 2 Tage wurde die Hälfte des MV2 Mediums entfernt und durch neues Medium ersetzt. Die Zellen wurden bis Passage 2 verwendet.

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

Zur Dokumentation der histologischen Präparate wurden zwei verschiedene Mikroskope eingesetzt: das Mikroskop *BX51* der Firma *Olympus* sowie das *LSM 710 Confocal* Mikroskop der Firma *Zeiss*. Von jedem Gewebeschnitt wurden mit einer 200-fachen Vergrößerung vier Bilder angefertigt, wenn möglich aus verschiedenen Bereichen des Gewebeschnittes. Mit Hilfe der Software *Image Pro Plus 7.0* der Firma *Media Cybernetics Inc.* wurden die angefertigten Bilder entweder pro Quadratmillimeter oder pro Muskelfaser ausgewertet. Zur grafischen Darstellung der Auswertungen wurde das Programm *Graph Pad Prism (Version 9.0.1)* genutzt.

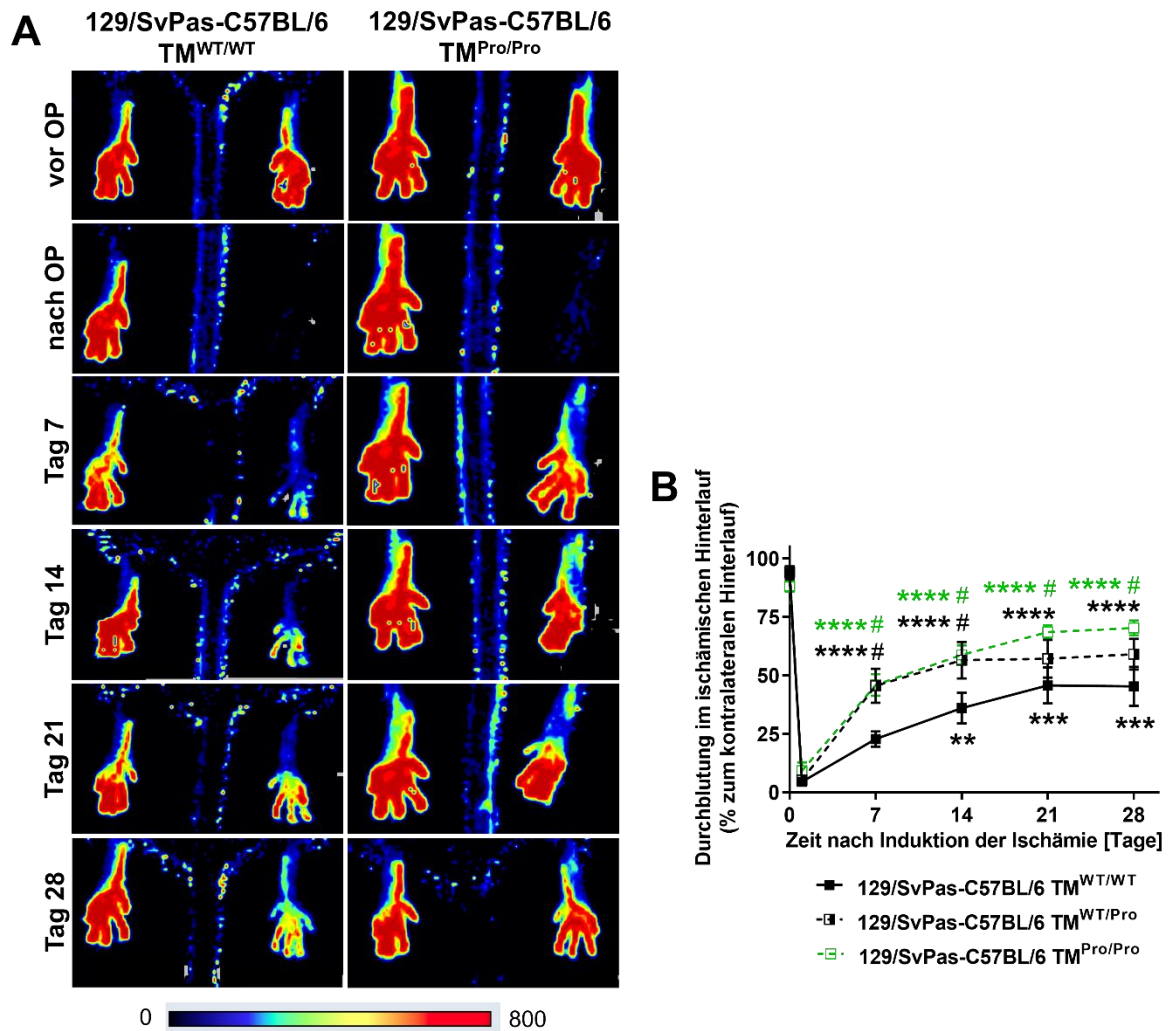
### **3.2.11 Statistische Auswertung**

Sämtliche Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) präsentiert. Die Normalverteilung wurde durch den *d' Agostino-Pearson Omnibus Normality Test* überprüft. Beim Vergleich von mehreren Gruppen zu einem Zeitpunkt wurden die Daten durch den *One-Way Analysis of Variance (ANOVA) Test*, beim Vergleich von zwei oder mehr Gruppen zu mehreren Zeitpunkten oder beim Vergleich derer rechten und linken Hinterläufe durch den *Two-Way ANOVA Test*, jeweils gefolgt vom *Sidak's multiple comparisons Test* verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % ( $p \leq 0,05$ ) festgelegt. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm *Graph Pad Prism (Version 9.0.1)* genutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bessere Reperfusion und erhöhte Endothelzellzahl bei $TM^{Pro/Pro}$ Mäusen im Vergleich zu $TM^{WT/WT}$ Kontrolltieren

Um die Bedeutung von Gerinnungsfaktoren für die regenerative Gefäßneubildung (Angiogenese) zu untersuchen, wurde zu Beginn dieser Arbeit zunächst die Mauslinie  $TM^{Pro/Pro}$  mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129/SvPas-C57BL/6) untersucht. Bei diesen Mäusen wurde eine einseitige Ligatur der *A. femoralis* durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.4), wodurch eine Ischämie im rechten Hinterlauf der Mäuse induziert wurde. Wie bereits in der Charakterisierung des Mausstamms in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, weisen  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse aufgrund einer Punktmutation im TM Gen, bei der an der Aminosäureposition 404 Glutaminsäure durch Prolin substituiert wird, eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit zur Hemmung des Gerinnungsfaktors Thrombin sowie zur Generierung von aktiviertem Protein C (aPC) auf (108). Mit Hilfe der nicht-invasiven *Laser Doppler Perfusion Imaging* (LDPI) Methode wurde prä- und postoperativ sowie im weiteren Versuchsablauf die Durchblutung der Hinterläufe der Mäuse gemessen. Repräsentative Bilder der LDPI Messung zeigt **Abbildung 5A**. Daran lässt sich eine deutlich bessere Reperfusion bei 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen im Vergleich zu ihren  $TM^{WT/WT}$  Wurfgeschwistern aus der Kontrollgruppe erkennen. Wie die Quantifizierung in **Abbildung 5B** bestätigt, wurde ein signifikanter Unterschied beginnend an Tag 7 bis einschließlich Tag 28 postoperativ zwischen  $TM^{Pro/Pro}$  Tieren und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern gemessen. Stellt man das LDPI Signal als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf in Prozent zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein dar, ergaben sich bei  $TM^{WT/WT}$  Mäusen folgende Werte: Tag 7 22,7 %, Tag 14 36,0 %, Tag 21 45,7 % und Tag 28 45,3 %. Bei den  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen konnte hingegen eine signifikant bessere Perfusion von 45,9 % an Tag 7, 58,8 % an Tag 14, 68,5 % an Tag 21 und 70,2 % an Tag 28 gemessen werden. Bei heterozygoten  $TM^{WT/Pro}$  Mäusen, die auf nur einem Allel die  $TM^{Pro}$  Mutation aufwiesen, konnte ebenfalls eine signifikant verbesserte Durchblutung im Vergleich zu den  $TM^{WT/WT}$  Wurfgeschwistern festgestellt werden, allerdings nur an Tag 7 (45,6 %) und Tag 14 (56,5 %) postoperativ. Bei den folgenden LDPI Messungen an Tag 21 (57,1 %) und Tag 28 (59,0 %) postoperativ wurde hingegen weder ein signifikanter Unterschied zu den  $TM^{WT/WT}$  noch zu den  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen gemessen.

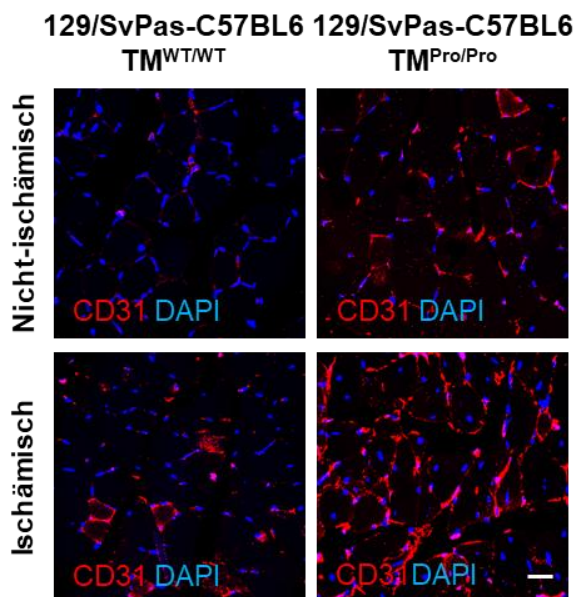


**Abbildung 5: Gefäßneubildung nach Ischämie bei 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen und deren  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltieren**

**(A)** Repräsentative Bilder der nicht-invasiven Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) Messung, dargestellt von 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  und deren  $TM^{Pro/Pro}$  Wurfgeschwistern. Gezeigt sind jeweils der linke und rechte Hinterlauf, gemessen direkt vor und nach der Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. **(B)** Quantifizierung des LDPI Signals bei Mäusen der Kontrollgruppe 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  ( $n=9$ ), sowie von  $TM^{Pro/Pro}$  ( $n=16$ ) und  $TM^{WT/Pro}$  ( $n=19$ ) Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf verglichen in % zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messungen waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ.  $**P<0,01$ ,  $***P<0,001$  und  $****P<0,0001$  vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe,  $\#P<0,05$  vs. 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltiere zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test erhoben.

## Ergebnisse

Um den Unterschied in der Reperfusion zwischen  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen und  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltieren auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden CD31-immunpositive Endothelzellen und DAPI-positive Zellkerne mittels einer Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. **Abbildung 6** zeigt repräsentative Confocal-Bilder dieser Immunfluoreszenzfärbung auf Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius*. Auf den mikroskopischen Bildern zeigt sich im ischämischen sowie im nicht-ischämischen Hinterlauf der  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse jeweils eine vermehrte Anzahl von CD31-immunpositiven Zellen (in Rot) verglichen mit den  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltieren desselben genetischen Hintergrunds. Vergleicht man bei beiden Mausgruppen den ischämischen Hinterlauf mit der kontralateralen, nicht-ischämischen Seite, stellt sich außerdem eine Zunahme an CD31-immunpositiven Zellen nach der Operation dar.

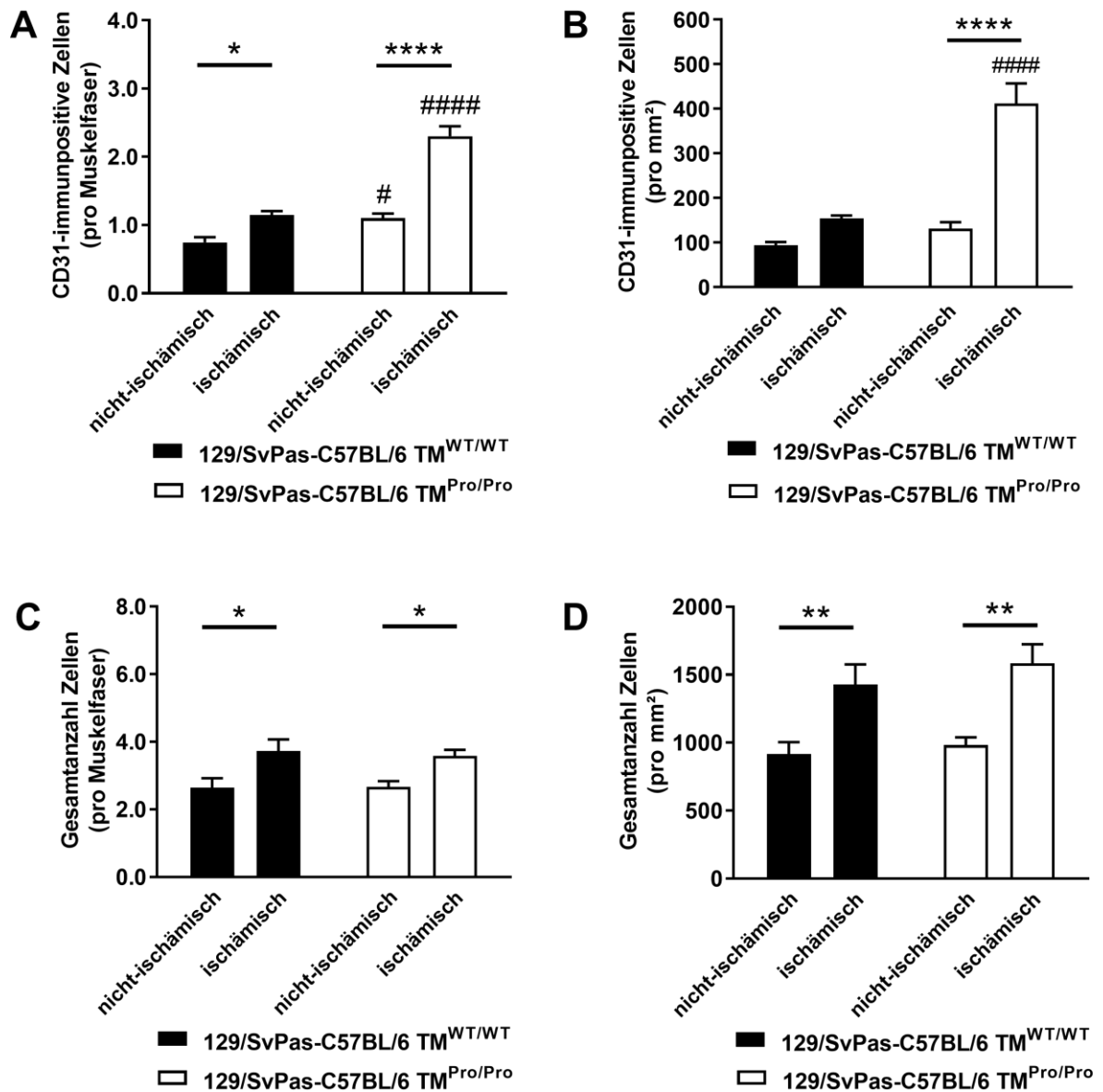


**Abbildung 6:** Darstellung von CD31-immunpositiven Zellen und Zellkernen (DAPI) bei 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen und deren  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltieren

Repräsentative Confocal-Bilder der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von CD31-immunpositiven Endothelzellen (rot) und Zellkernen (DAPI; blau) im *M. gastrocnemius* von 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  Mäusen und deren  $TM^{Pro/Pro}$  Wurfgeschwistern. Dargestellt ist jeweils der nicht-ischämische und der ischämische Hinterlauf. Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m.



Die Quantifizierung in **Abbildung 7A** bestätigt die Beobachtungen der Immunfluoreszenzfärbung. Im unverletzten Hinterlauf der  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse konnten durchschnittlich  $1,1 \pm 0,07$  (MW  $\pm$  SEM) CD31-immunpositive Zellen pro Muskelfaser ermittelt werden, mit  $2,3 \pm 0,15$  (MW  $\pm$  SEM) im operierten Hinterlauf ließ sich hier eine signifikante Zunahme vermerken. Die gleiche Tendenz zeigte die Quantifizierung der Kontrolltiere. Im nicht-ischämischen Bein wurden im Durchschnitt  $0,74 \pm 0,08$  (MW  $\pm$  SEM) CD31-immunpositive Zellen pro Muskelfaser gezählt, im ischämischen Bein  $1,15 \pm 0,05$  (MW  $\pm$  SEM), auch hier ergab sich somit eine signifikante Zunahme. Vergleicht man die beiden Mauslinien miteinander, zeigt sich zwischen den beiden operierten Hinterläufen ein besonders deutlicher Unterschied. Die mutierten  $TM^{Pro/Pro}$  Tiere wiesen im Durchschnitt signifikant mehr Endothelzellen auf als ihre  $TM^{WT/WT}$  Wurfgeschwister. Darüber hinaus wurde die Anzahl der CD31-immunpositiven Zellen auch pro  $mm^2$  bestimmt (**Abbildung 7B**). Bei den Kontrolltieren konnte hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen dem rechten und linken Hinterlauf vermerkt werden, im nicht-ischämischen Bein wurden  $93,8 \pm 7,24$  (MW  $\pm$  SEM) Endothelzellen pro  $mm^2$  gezählt, im ischämischen Bein  $154 \pm 6,28$  (MW  $\pm$  SEM). Bei den  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen wurde hingegen ein signifikanter Anstieg in der Anzahl an Endothelzellen zwischen dem linken und rechten Bein festgestellt, von  $131 \pm 14,4$  (MW  $\pm$  SEM) auf  $411 \pm 45,1$  (MW  $\pm$  SEM). Zusätzlich zur Quantifizierung der CD31-immunpositiven Zellen wurde auch die Gesamtzellzahl durch Ermittlung der DAPI-positiven Zellkerne pro Muskelfaser und  $mm^2$  analysiert (**Abbildungen 7C und 7D**). Hierbei konnten zwar stets signifikant mehr Zellen im ischämischen Hinterlauf verglichen mit dem nicht-ischämischen Hinterlauf quantifiziert werden, es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mausgruppen festgestellt werden. Pro Muskelfaser konnten bei den Kontrolltieren im unverletzten Hinterlauf im Durchschnitt  $2,64 \pm 0,28$  (MW  $\pm$  SEM) und im operierten Hinterlauf  $3,73 \pm 0,34$  (MW  $\pm$  SEM) Zellkerne gezählt werden. Bei den  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen waren es  $2,67 \pm 0,16$  (MW  $\pm$  SEM) im linken Bein und  $3,58 \pm 0,18$  (MW  $\pm$  SEM) im rechten Bein. Die Bestimmung pro  $mm^2$  ergab bei den Kontrolltieren im nicht-ischämischen Hinterlauf  $917 \pm 86,8$  (MW  $\pm$  SEM) Zellkerne und im ischämischen Hinterlauf  $1427 \pm 148$  (MW  $\pm$  SEM). Bei den  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen waren es  $982 \pm 57,3$  (MW  $\pm$  SEM) Zellkerne im unverletzten und  $1584 \pm 140$  (MW  $\pm$  SEM) im ischämischen Bein.

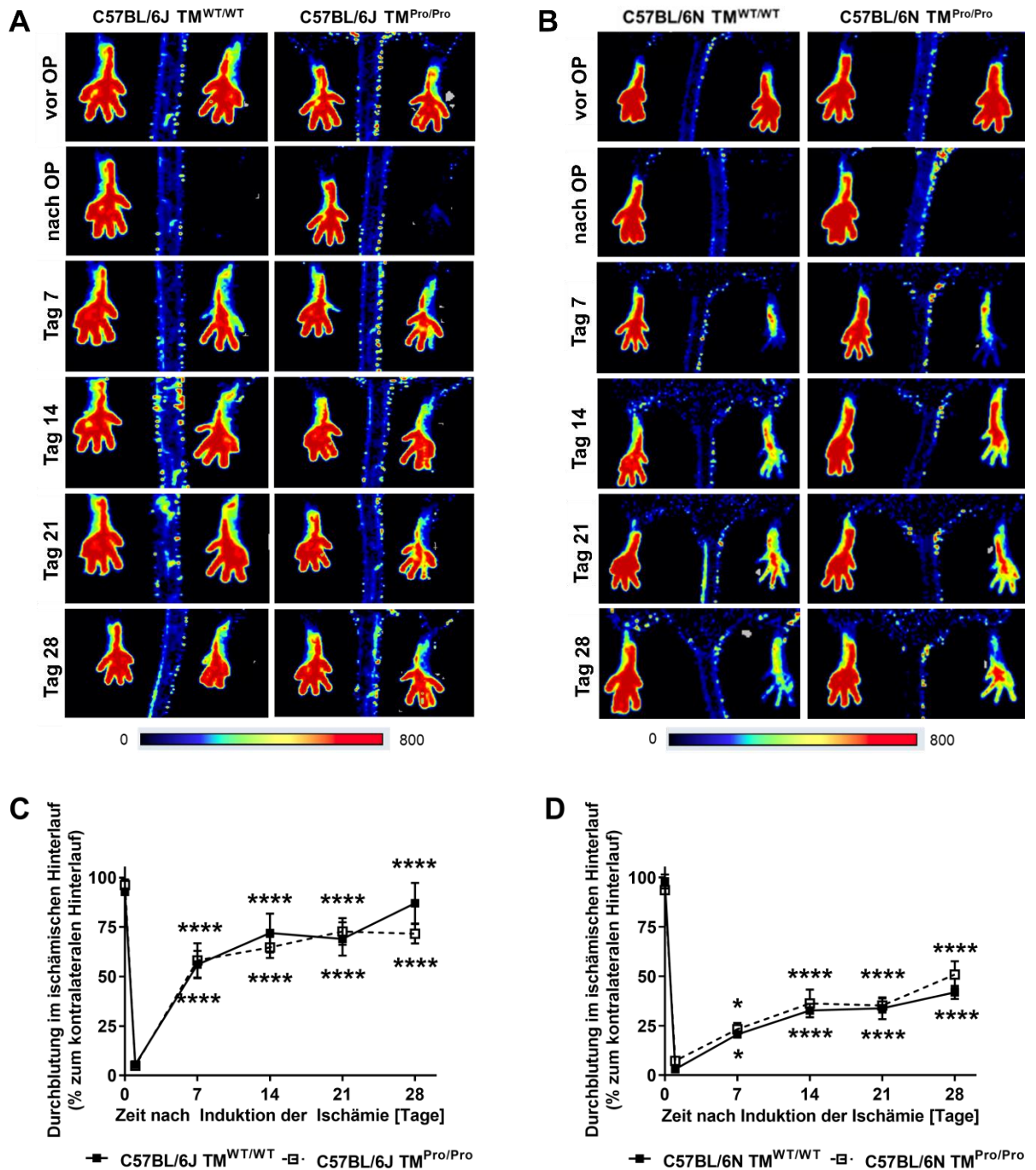


**Abbildung 7: Quantifizierung von CD31-immunpositiven Zellen sowie der Gesamtzellzahl bei 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen und deren  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltieren**

Die Ergebnisse der Quantifizierung der CD31-immunpositiven Zellen sind pro Muskelfaser (A) und pro  $mm^2$  (B) dargestellt.  $TM^{Pro/Pro}$  (n=10) und  $TM^{WT/WT}$  (n=10) Mäuse waren Wurfgeschwister mit dem gleichen genetischen Hintergrund (129/SvPas-C57BL/6). Die Ergebnisse der Quantifizierung der Gesamtzellzahl ist ebenfalls dargestellt pro Muskelfaser (C) und pro  $mm^2$  (D) von  $TM^{WT/WT}$  (n=7) und  $TM^{Pro/Pro}$  (n=7) Mäusen. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  und \*\*\*\* $P < 0,0001$  vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf, # $P < 0,05$  und ##### $P < 0,0001$  vs. Kontrollgruppe  $TM^{WT/WT}$ . Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### 4.2 Unterschiedliche Wiederherstellung der Durchblutung nach Ischämie bei $TM^{Pro/Pro}$ Mäusen mit homogenem C57BL/6J oder C57BL/6N Hintergrund

Wie bereits in anderen Studien beschrieben wurde, hat der genetische Hintergrund der Mäuse einen entscheidenden Einfluss auf die Thrombomodulin Mutation (109). Daher verglichen wir in einem nächsten Schritt  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse, die einen homogenen C57BL/6J oder C57BL/6N Hintergrund aufwiesen. Als Kontrollgruppe dienten uns  $TM^{WT/WT}$  Mäuse mit dem jeweils selben genetischen Hintergrund, die Wurfgeschwister der  $TM^{Pro/Pro}$  Tiere waren. Die Tiere stellte uns ... zur Verfügung. Bei ihnen wurde, ebenso wie bei den zuvor untersuchten Mäusen, eine Ligatur der *A. femoralis* durchgeführt, um eine Ischämie im rechten Hinterlauf zu induzieren. Im weiteren Versuchsablauf wurde die Perfusion beider Hinterläufe mittels der nicht-invasiven LDPI Messung ermittelt. Wie in den repräsentativen Bildern der LDPI Messung in den **Abbildungen 8A und 8B** ersichtlich ist, wiesen sowohl C57BL/6J als auch C57BL/6N  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse jeweils eine ähnliche Reperfusion auf wie ihre entsprechenden Wildtyp Kontrolltiere. Vergleicht man die LDPI Signale beider Mauslinien miteinander, waren Mäuse mit dem genetischen C57BL/6J Hintergrund durch eine schnellere Wiederherstellung der Durchblutung als C57BL/6N Mäuse gekennzeichnet. Die quantitative Analyse der LDPI Signale in den **Abbildungen 8C und 8D** bestätigt diese Beobachtungen. Die dargestellten Linien der  $TM^{Pro/Pro}$  und der  $TM^{WT/WT}$  Mäuse verlaufen bei beiden Mausgruppen jeweils dicht beieinander, es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Stattdessen zeichnet sich die schnellere Reperfusion der C57BL/6J Mäuse deutlich ab. An Tag 7 lag bei den C57BL/6J  $TM^{Pro/Pro}$  Tieren die Durchblutung im ischämischen Hinterlauf durchschnittlich bei 58 % im Vergleich zum kontralateralen, nicht ischämischen Bein. An Tag 28 waren es sogar 71,6 %. Bei  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen mit dem C57BL/6N Hintergrund hingegen lagen diese Werte deutlich niedriger, im Durchschnitt bei nur 23,2 % an Tag 7 und 50,9 % an Tag 28. Betrachtet man den Verlauf der Kurven, wurden sowohl bei den mutierten Mäusen als auch bei den Kontrolltieren beider Mauslinien zu allen Zeitpunkten (Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ) signifikante Unterschiede in der Reperfusion im Vergleich zur Durchblutung direkt nach der Operation (Tag 0) gemessen.



**Abbildung 8: Gefäßneubildung nach Ischämie bei TM<sup>Pro/Pro</sup> und TM<sup>WT/WT</sup> Mäusen mit einem C57BL/6J oder C57BL/6N genetischen Hintergrund**

(A, B) Repräsentative Bilder der nicht invasiven Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) Messung, dargestellt von C57BL/6J und C57BL/6N TM<sup>Pro/Pro</sup> Mäusen sowie deren jeweiligen Wildtyp Kontrolltieren. Gezeigt sind jeweils der linke und rechte Hinterlauf, gemessen direkt vor und nach der Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. (C, D) Gezeigt ist die Quantifizierung der LDPI Signale. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf in % verglichen zum kontralateralen, nicht ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messung waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. Die Messung wurde durchgeführt bei C57BL/6J TM<sup>WT/WT</sup> (n=9), C57BL/6J TM<sup>Pro/Pro</sup> (n=7), C57BL/6N TM<sup>WT/WT</sup> (n=10) und C57BL/6N TM<sup>Pro/Pro</sup> (n=9) Mäusen. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 und \*\*\*\*P<0,0001 vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

### 4.3 Erhöhte EPCR Expression bei 129/SvPas-C57BL/6 $TM^{Pro/Pro}$ Mäusen

Der genetische Hintergrund der Mäuse hat nicht nur Einfluss auf die Ausprägung der TM Mutation, auch die Expression des Endothelialen Protein C Rezeptors wird dadurch beeinflusst. Das EPCR Gen liegt dem Agouti Locus dicht an, welcher die Information für die Fellfarbe trägt (117). Um EPCR nachweisen zu können, wurde Lungengewebe der Mäuse entnommen, lysiert und mit Hilfe der Western Blot Methode in die einzelnen Proteinbestandteile aufgetrennt. Die Gewinnung des Lungenhomogenats sowie die Western Blot Analyse wurde von ... aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Mit Hilfe der Western Blot Analyse konnten wir einen deutlichen Unterschied in der EPCR Expression im Lungenhomogenat zwischen C57BL/6J, C57BL/6N und 129/SvPas-C57BL/6 Mäusen erkennen. Das Ergebnis der Western Blot Analyse ist **Abbildung 9A**, die dazugehörige Quantifizierung **Abbildung 9B** zu entnehmen. Bei 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen, die eine braune Fellfarbe aufzeigten, ließ sich eine signifikant höhere EPCR Proteinexpression im Lungengewebe nachweisen als bei deren Wildtyp Wurfgeschwistern mit einer schwarzen Fellfarbe. Bei Mäusen mit dem C57BL/6J oder C57BL/6N genetischen Hintergrund hingegen war nur eine geringe Expression von EPCR nachweisbar, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  Tieren.

Um zeigen zu können, dass die verstärkte EPCR Expression auf Endothelzellen zurückzuführen ist und nicht durch andere Zellen bedingt ist, wurden im nächsten Schritt primäre murine pulmonale Endothelzellen isoliert und deren EPCR Expression untersucht. Hierfür wurde das Lungengewebe von 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  und C57BL/6N  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen sowie von deren Wildtyp Wurfgeschwistern als Kontrolle herangezogen. Das Ergebnis der Western Blot Analyse kann **Abbildung 9C**, die dazugehörige Quantifizierung **Abbildung 9D** entnommen werden. Wie bereits zuvor im Lungenhomogenat lag bei den 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  Tieren eine signifikant höhere EPCR Expression im Vergleich zu den anderen Mausgruppen vor. Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung, welche in **Abbildung 9E** gezeigt ist, konnten wir die verstärkte EPCR Expression in Endothelzellen dann auch auf Gewebeschnitten des nicht-ischämischen Hinterlaufs dieser Mäuse visualisieren. Bei Mäusen mit dem C57BL/6N genetischen Hintergrund wurde EPCR hingegen nur schwach exprimiert.

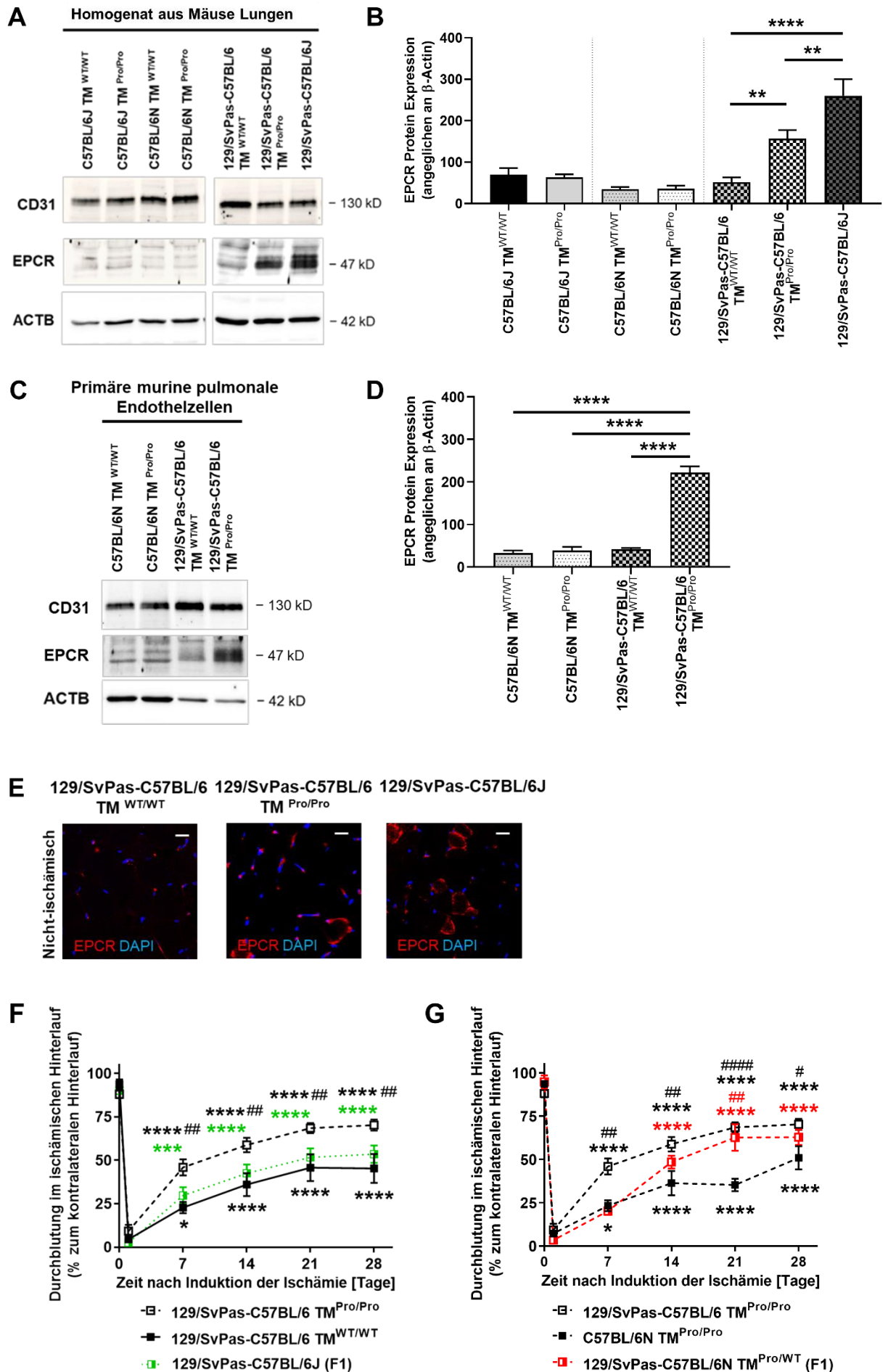
In einem weiteren Schritt wurden 129/SvPas Mäuse mit C57BL/6J Mäusen gekreuzt. Das Lungengewebe der direkten Nachkommen dieser Kreuzung (F1 Generation;

129SvPas-C57BL/6J) wurde ebenfalls in einer Western Blot Analyse auf die Expression von EPCR untersucht (**Abbildungen 9A und 9B**). Bei diesen Mäusen, die keine Mutation im TM Gen aufwiesen, zeigte sich eine signifikant verstärkte Expression des EPCR Proteins verglichen mit den 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  und  $TM^{WT/WT}$  Mäusen. Gleiches stellte sich in der EPCR-Immunfluoreszenzfärbung in **Abbildung 9E** dar. Somit konnte der Zusammenhang zwischen EPCR Expression und genetischem Hintergrund hergestellt werden, der unabhängig von der  $TM^{Pro}$  Mutation ist.

Um nun auch die Bedeutung der unterschiedlichen EPCR Expression in Endothelzellen für die Gefäßneubildung zu untersuchen, wurde bei o.g. Tieren eine Hinterlaufischämie induziert. In **Abbildung 9F** ist die Quantifizierung der LDPI Signale der verschiedenen Mausgruppen visualisiert. Die Mäuse der Gruppen 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  sowie 129SvPas-C57BL/6J zeigten in der Western Blot Analyse beide eine erhöhte EPCR Expression, die Reperfusion stellte sich bei 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen allerdings deutlich besser dar. Bei Tieren dieser Gruppe lag die Durchblutung verglichen zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein an Tag 7 bei 45,9 %, an Tag 14 bei 58,8 %, an Tag 21 bei 68,5 % und an Tag 28 bei 70,2 %. Bei 129SvPas-C57BL/6J Mäusen lag die Durchblutung hingegen nur bei 29,7 % an Tag 7, 42,5 % an Tag 14, 51,7 % an Tag 21 und 53,5 % an Tag 28.

**Abbildung 9G** zeigt eine weitere Quantifizierung der LDPI Signale verschiedener Mausgruppen. C57BL/6N  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse zeigten den Ergebnissen der Western Blot Analyse zufolge eine geringe EPCR Expression, dies stellte sich in einer reduzierten Reperfusion des ischämischen Hinterlaufs im Vergleich zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein dar. Es ergaben sich folgende Werte: Tag 7 23,2 %, Tag 14 36,2 %, Tag 21 35,2 %, Tag 28 50,9 %. Betrachtet man hingegen die F1 Generation (129/SvPas-C57BL/6N  $TM^{Pro/WT}$ ) aus einer Kreuzung dieser C57BL/6N  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse mit 129/SvPas Mäusen, stellt sich eine verbesserte Reperfusion an den Tagen 14, 21 und 28 dar. An Tag 7 lag die Durchblutung des ischämischen Hinterlaufs noch bei 20,2 %, im Verlauf an Tag 14 bei 48,4 %, an Tag 21 bei 62,7 % und an Tag 28 bei 62,8 %. Die beste Reperfusion zeigte sich jedoch weiterhin bei  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen mit einem 129/SvPas-C57BL/6 genetischen Hintergrund.

Diese Ergebnisse lassen uns schlussfolgern, dass eine vermehrte EPCR Expression in Endothelzellen eine mögliche Ursache für die beobachtete verbesserte Wiederherstellung der Durchblutung von  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen sein könnte.



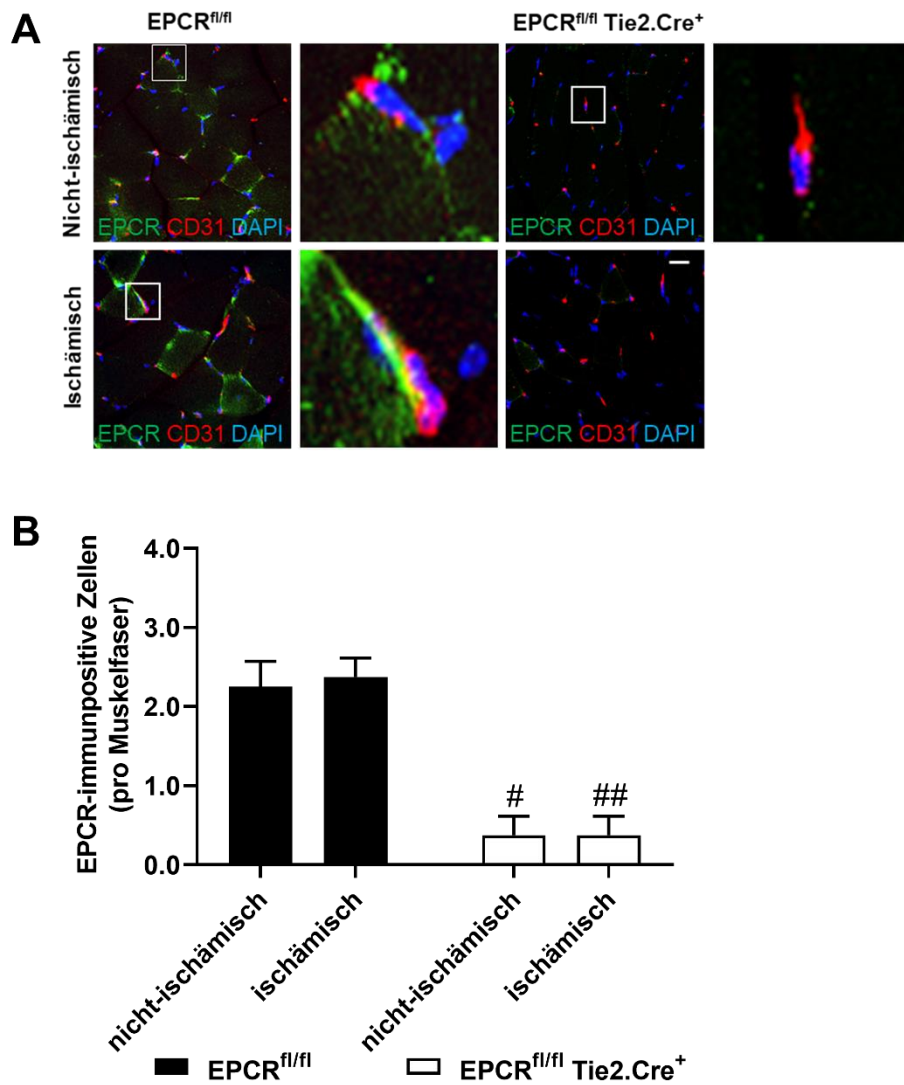
### **Abbildung 9: Analyse der endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) Expression sowie dessen Einfluss auf die Wiederherstellung der Durchblutung nach Induktion einer Hinterlaufischämie**

**(A)** Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western Blot Analyse aus Lungenhomogenat von  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen mit 129/SvPas-C57BL/6, C57BL/6J oder C57BL/6N genetischem Hintergrund sowie von deren Wildtyp Kontrolltieren, zusätzlich von 129/SvPas-C57BL/6J Mäusen. Gezeigt ist die Stärke der Expression von CD31 (-130 kD) und EPCR (-47 kD).  $\beta$ -Actin (ACTB) wurde als Kontrolle für die Proteinbeladung verwendet. **(B)** Quantifizierung der Western Blot Analyse aus Lungenhomogenat von 129/SvPas-C57BL/6, C57BL/6J und C57BL/6N, jeweils  $TM^{Pro/Pro}$  und  $TM^{WT/WT}$  Mäuse. Zusätzlich 129/SvPas-C57BL/6J Mäuse. Pro Mausgruppe  $n=3$ .  $**P<0,01$  und  $****P<0,0001$  vs. der anderen Mausgruppen zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des One-Way-ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt. **(C)** Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western Blot Analyse von primären murinen pulmonalen Endothelzellen aus  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen mit 129/SvPas-C57BL/6 oder C57BL/6N genetischem Hintergrund sowie von deren Wildtyp Kontrolltieren. Gezeigt ist die Stärke der Expression von CD31 (-130 kD) und EPCR (-47 kD).  $\beta$ -Actin (ACTB) wurde als Kontrolle für die Proteinbeladung verwendet. **(D)** Quantifizierung der Western Blot Analyse von primären murinen pulmonalen Endothelzellen von 129/SvPas-C57BL/6 und C57BL/6N Mäusen. Pro Mausgruppe  $n=3$ .  $****P<0,0001$  vs. der anderen Mausgruppen zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des One-Way-ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt. **(E)** Repräsentative Confocal-Bilder der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von EPCR (rot) und Zellkernen (DAPI; blau) im *M. gastrocnemius* von 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  und deren  $TM^{Pro/Pro}$  Wurfgeschwistern, sowie von 129/SvPas-C57BL/6J Mäusen. Dargestellt ist der nicht-ischämische Hinterlauf. Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. **(F)** Quantifizierung des LDPI Signals von 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  ( $n=16$ ), 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  ( $n=9$ ) und 129/SvPas-C57BL/6J ( $n=10$ ) Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf verglichen in % zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messung waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ.  $*P<0,05$ ,  $***P<0,001$  und  $****P<0,0001$  vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe,  $##P<0,01$  vs. 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test erhoben. **(G)** Quantifizierung des LDPI Signals von 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{Pro/Pro}$  ( $n=16$ ), C57BL/6N  $TM^{Pro/Pro}$  ( $n=9$ ) und 129/SvPas-C57BL/6N  $TM^{Pro/WT}$  ( $n=5$ ) Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf verglichen in % zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messung waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ.  $**P<0,01$ ,  $***P<0,001$  und  $****P<0,0001$  vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe,  $#####P<0,0001$  vs. C57BL/6N  $TM^{Pro/Pro}$  zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test erhoben.



#### 4.4 Reduzierte endotheliale EPCR Expression bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen

Um die Bedeutung von EPCR für die Gefäßneubildung nach Ischämie näher betrachten zu können, untersuchten wir im nächsten Schritt die Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup>, welche einen C57BL/6N genetischen Hintergrund trug. Diese Mäuse wurden uns von ... zur Verfügung gestellt und ebenfalls einer Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie unterzogen (siehe Abschnitt 3.2.4). Wie bereits in der Charakterisierung dieses Mausstamms in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben, wird bei diesen Tieren das EPCR<sup>flox</sup> Allel konstitutiv durch die Tie2.Cre-Rekombinase ausgeschnitten, wodurch es zu einer Deletion des EPCR auf Endothelzellen, aber auch auf myeloischen und hämatopoetischen Zellen kommt. Als Kontrolltiere dienten uns EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäuse, ebenfalls von ... , bei denen die Tie2.Cre-Rekombinase nicht aktiv war und somit EPCR unter anderem auf Endothelzellen exprimiert werden konnte. EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäuse waren Wurfgeschwister. Die Abwesenheit des EPCR bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen konnte mittels einer Immunfluoreszenzfärbung visualisiert werden, bei der sowohl CD31 in Rot als auch EPCR in Grün angefärbt wurde. Repräsentative Confocal-Bilder von Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius* zeigt **Abbildung 10A**. Bei Mäusen der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup> zeigten sich doppelt positive Zellen, vorwiegend Endothelzellen, die auf ihrer Oberfläche zusätzlich EPCR exprimierten. Bei Mäusen der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> hingegen färbten sich nur die Endothelzellen an, ohne dass EPCR nachgewiesen werden konnte. **Abbildung 10B** zeigt eine Quantifizierung der EPCR-immunpositiven Zellen pro Muskelfaser im ischämischen und nicht-ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen. Bei EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäusen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem rechten und linken Hinterlauf, im nicht-ischämischen Bein konnten  $2,25 \pm 0,32$  (MW  $\pm$  SEM) EPCR-immunpositive Zellen gezählt werden, im ischämischen Bein  $2,38 \pm 0,24$  (MW  $\pm$  SEM). Eine im Vergleich zu den EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren signifikant reduzierte Anzahl an EPCR-immunpositiven Zellen lag hingegen bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen vor, hier ergaben sich  $0,35 \pm 0,21$  (MW  $\pm$  SEM) im unverletzten und  $0,38 \pm 0,24$  (MW  $\pm$  SEM) im ischämischen Hinterlauf.



**Abbildung 10: EPCR Expression auf Endothelzellen bei Mäusen der Mauslinien EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup>**

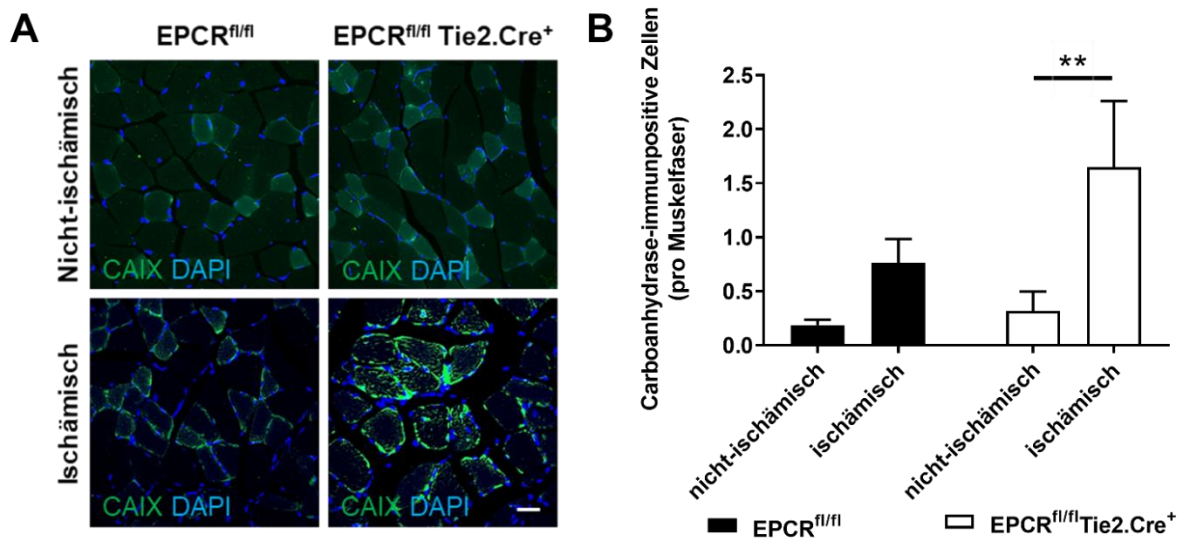
(A) Gezeigt sind repräsentative Confocal-Bilder zur Darstellung von CD31 (rot), EPCR (grün) und Zellkernen (DAPI; blau) auf Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäusen und deren EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Wurfgeschwistern. Sowohl der ischämische als auch der nicht-ischämische Hinterlauf sind gezeigt. Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. (B) Ergebnis der Quantifizierung von EPCR-immunopositiven Zellen pro Muskelfaser im ischämischen und nicht-ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=4) und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=4) Mäusen. #P<0,05 und ##P<0,01 vs. Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### **4.5 (Immun-)histochemische Charakterisierung des *M. gastrocnemius* nach einseitig induzierter Ischämie bei EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Zusammensetzung des *M. gastrocnemius* der Mäuse nach einseitig induzierter Hinterlauf-Ischämie (immun-)histochemisch zu charakterisieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen vorgestellt.

##### **4.5.1 Immunhistochemischer Nachweis von Gewebe-Hypoxie mittels Carboanhydrase IX**

In einer ersten Immunfluoreszenzfärbung wurde mittels eines Antikörpers gegen das HIF1 $\alpha$  Zielgen Carboanhydrase IX Hypoxie als Zeichen der Gewebsschädigung dargestellt. Diese Färbung wurde auf Schnitten des *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen durchgeführt. Repräsentative Confocal-Bilder sind in **Abbildung 11A** dargestellt und zeigen einen vermehrten Nachweis an Carboanhydrase IX in Grün im ischämischen Hinterlauf von Tieren der Mausgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup>. Die quantitative Analyse ist in **Abbildung 11B** dargestellt, welche keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mauslinien EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> zeigt. Bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen konnten im linken, nicht operierten Hinterlauf durchschnittlich  $0,32 \pm 0,18$  (MW  $\pm$  SEM) Carboanhydrase-immunpositive Zellen pro Muskelfaser gezählt werden. Im rechten, operierten Hinterlauf konnte eine signifikante Zunahme auf  $1,65 \pm 0,61$  (MW  $\pm$  SEM) vermerkt werden. Bei den Kontrolltieren der Mausgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup> war der Unterschied zwischen dem rechten und linken Hinterlauf deutlich geringer ausgeprägt. Im linken, nicht-ischämischen Hinterlauf ergab die Quantifizierung im Durchschnitt  $0,19 \pm 0,05$  (MW  $\pm$  SEM) Carboanhydrase-immunpositive Zellen, im rechten, ischämischen Bein war eine leichte, nicht signifikante Zunahme auf  $0,76 \pm 0,22$  (MW  $\pm$  SEM) zu sehen.

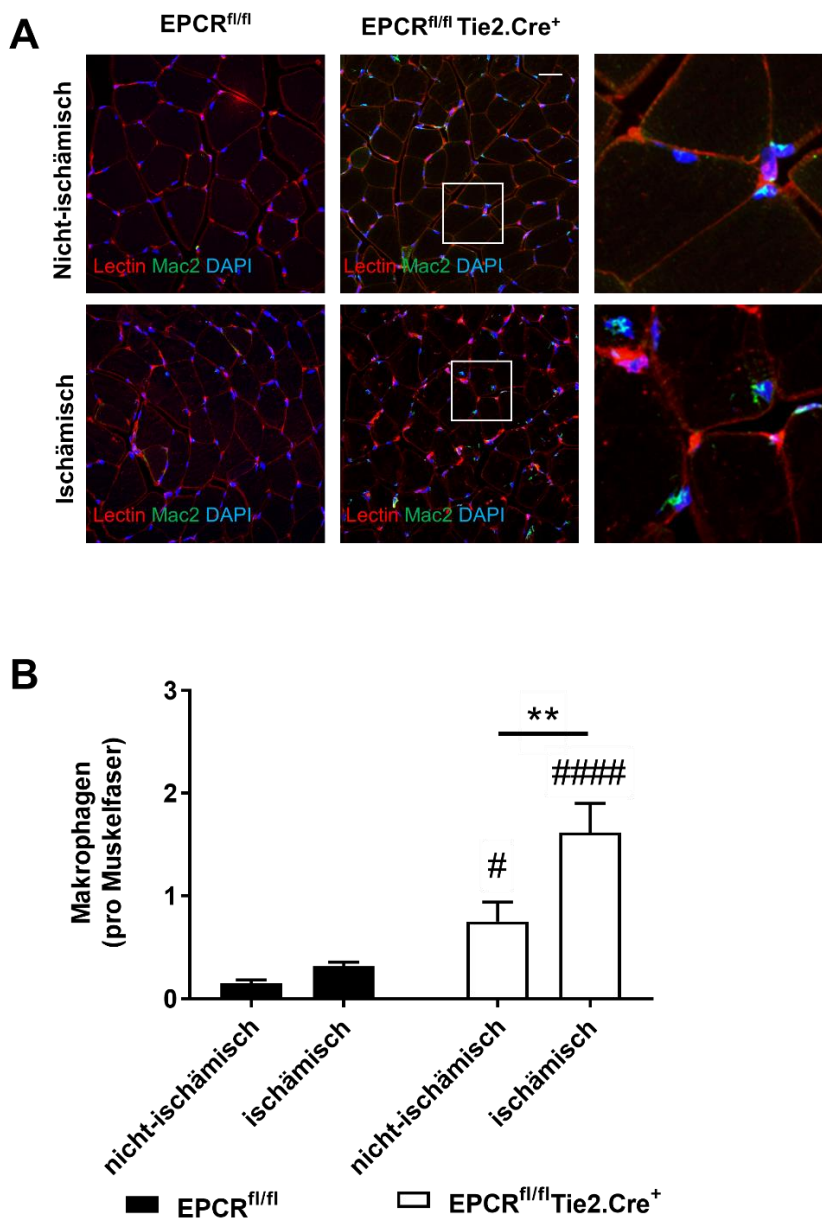


**Abbildung 11: Darstellung und Quantifizierung von Carboanhydrase (CAIX)-immunpositiven Zellen als Hypoxie Marker im Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen**

(A) Repräsentative Confocal-Bilder der Carboanhydrase IX Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von hypoxischen Zellen in Gewebeschnitten des ischämischen und nicht-ischämischen *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren und deren EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Wurfgeschwistern. In Grün sind Carboanhydrase (CAIX)-immunpositive Zellen dargestellt, in Blau die Zellkerne (DAPI). Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der Carboanhydrase-immunpositiven Zellen pro Muskelfaser von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=4) und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=5) Mäusen. \*\*P<0,01 vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### 4.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von Makrophagen

In einem weiteren Schritt untersuchten wir das Muskelgewebe von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen auf das Vorhandensein von Makrophagen. Bei der Darstellung und Quantifizierung der Anzahl an Makrophagen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen. In **Abbildung 12A** sind repräsentative Confocal-Bilder der Mac2 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von Makrophagen in Grün gezeigt, Endothelzellen erscheinen in Rot. Auf den Bildern der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup> sind sowohl im ischämischen als auch im nicht-ischämischen Hinterlauf nur vereinzelte bis keine Makrophagen zu erkennen. Bei der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> hingegen zeigt sich vor allem im ischämischen Hinterlauf eine deutliche Zunahme an Makrophagen. Die dazugehörige quantitative Analyse kann **Abbildung 12B** entnommen werden. Pro Muskelfaser konnten im linken, nicht-ischämischen Bein von Mäusen der Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup> im Schnitt  $0,15 \pm 0,03$  (MW  $\pm$  SEM) Makrophagen gezählt werden, im rechten ischämischen Bein waren es  $0,32 \pm 0,04$  (MW  $\pm$  SEM). Bei Tieren der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> konnten im unverletzten Bein durchschnittlich  $0,75 \pm 0,19$  (MW  $\pm$  SEM) Makrophagen quantifiziert werden. Im ischämischen Hinterlauf konnte eine signifikante Zunahme auf  $1,62 \pm 0,28$  (MW  $\pm$  SEM) Makrophagen vermerkt werden. Somit konnten sowohl im ischämischen als auch im nicht-ischämischen Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse signifikant mehr Makrophagen gezählt werden als im jeweiligen Bein der EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltiere.

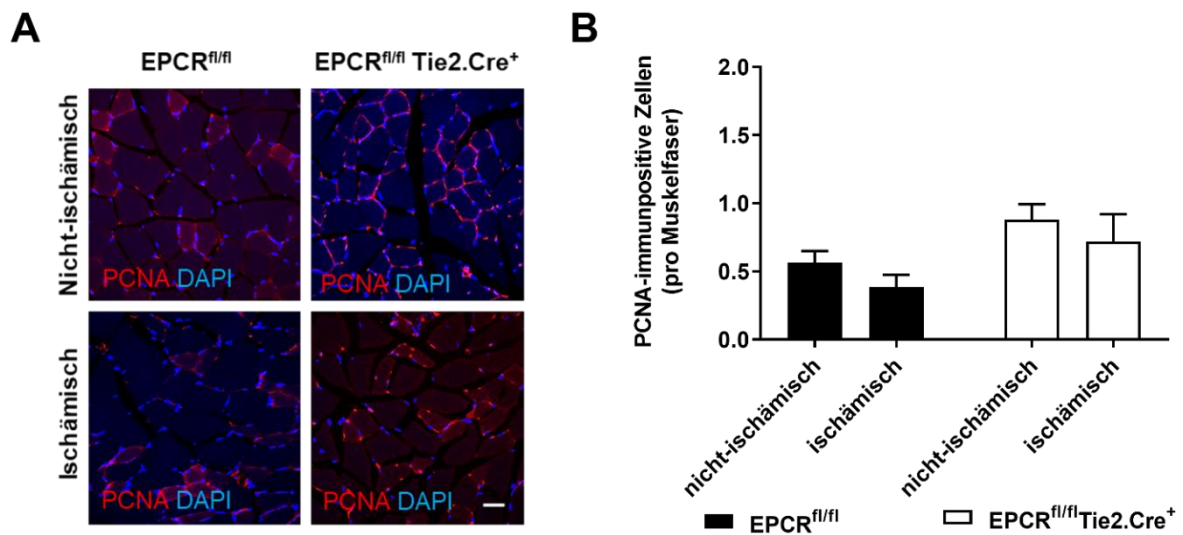


**Abbildung 12: Darstellung und Quantifizierung von Mac2-positiven Makrophagen im Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen**

(A) Repräsentative Confocal-Bilder der Mac2 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von Makrophagen in Gewebeschnitten des ischämischen und nicht-ischämischen *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren und deren EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Wurfgeschwistern. In Grün sind Makrophagen dargestellt, Endothelzellen mittels Lectin in Rot und Zellkerne (DAPI) in Blau. Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der Mac2-immunpositiven Zellen pro Muskelfaser von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=3) und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=3) Mäusen. \*\*P<0,01 vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf, #P<0,05 und #####P<0,0001 vs. Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

### 4.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von Zellproliferation mittels PCNA

Eine weitere Frage, die sich uns stellte, war ob aufgrund der induzierten Ischämie Unterschiede in der Zellproliferation zwischen  $EPCR^{fl/fl}$  und  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Mäusen zu erkennen sind. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) konnten die proliferativen Zellen im *M. gastrocnemius* detektiert und dargestellt werden. **Abbildung 13A** zeigt repräsentative Confocal-Bilder der Immunfluoreszenzfärbung. Bei der Quantifizierung, dargestellt in **Abbildung 13B**, konnten im linken, unverletzten Bein von  $EPCR^{fl/fl}$  Mäusen durchschnittlich  $0,56 \pm 0,09$  (MW  $\pm$  SEM) PCNA-immunpositive Zellen pro Muskelfaser gezählt werden. Auf der Gegenseite, im rechten operierten Bein, waren es im Durchschnitt hingegen nur  $0,39 \pm 0,09$  (MW  $\pm$  SEM) immunpositive Zellen, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Insgesamt zeigten sich bei Tieren der Mauslinie  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  leicht, jedoch nicht signifikant höhere Werte. Im nicht-ischämischen Bein konnten durchschnittlich  $0,88 \pm 0,11$  (MW  $\pm$  SEM) PCNA-immunpositive Zellen pro Muskelfaser quantifiziert werden, im ischämischen Hinterlauf nur  $0,72 \pm 0,20$  (MW  $\pm$  SEM). Auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant.



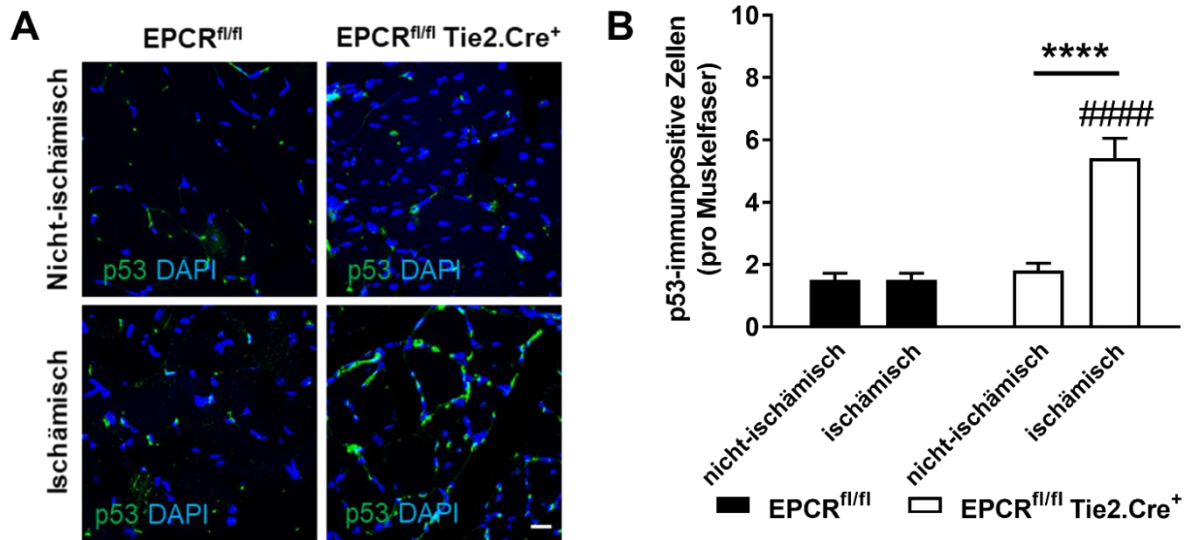
**Abbildung 13: Darstellung und Quantifizierung von Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-immunpositiven Zellen als Marker der Zellproliferation im Hinterlauf von  $EPCR^{fl/fl}$  und  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Mäusen**

**(A)** Repräsentative Confocal-Bilder der PCNA Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von proliferativen Zellen in Gewebeschnitten des ischämischen und nicht-ischämischen *M. gastrocnemius* von  $EPCR^{fl/fl}$  Kontrolltieren und deren  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Wurfgeschwistern. In Rot sind PCNA-immunpositive Zellen dargestellt, in Blau die Zellkerne (DAPI). Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. **(B)** Quantitative Analyse der PCNA-immunpositiven Zellen pro Muskelfaser von  $EPCR^{fl/fl}$  ( $n=4$ ) und  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  ( $n=5$ ) Mäusen. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### 4.5.4 Immunhistochemischer Nachweis von apoptotischen Zellen

In einer weiteren Immunfluoreszenzfärbung stellten wir den Apoptosemarker p53 auf Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen dar. Die repräsentativen Confocal-Bilder in **Abbildung 14A** zeigen eine stark vermehrte Anzahl an p53-immunpositiven Zellen in der ischämischen Muskulatur von Mäusen der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup>. Mit der Immunfluoreszenzfärbung wurden sowohl p53- als auch CD31-immunpositive Zellen angefärbt. Zur besseren Veranschaulichung der p53 Expression sind in **Abbildung 14A** Confocal-Bilder dargestellt, bei denen das CD31 Signal ausgeblendet wurde. Die quantitative Analyse in **Abbildung 14B** verdeutlicht die signifikant vermehrte Anzahl an p53 immunpositiven Zellen im ischämischen Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse verglichen mit dem der EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltiere. Im ischämischen Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse waren im Durchschnitt  $5,40 \pm 0,65$  (MW  $\pm$  SEM) apoptotische Zellen pro Muskelfaser zu sehen, im nicht-ischämischen Hinterlauf konnte hingegen eine signifikante Abnahme auf durchschnittlich nur  $1,80 \pm 0,25$  (MW  $\pm$  SEM) festgestellt werden. Bei Mäusen der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup> stellte sich zwischen dem rechten und linken *M. gastrocnemius* kein Unterschied in der Anzahl an p53 immunpositiven Zellen dar, jeweils konnten  $1,50 \pm 0,22$  (MW  $\pm$  SEM) pro Muskelfaser gezählt werden.



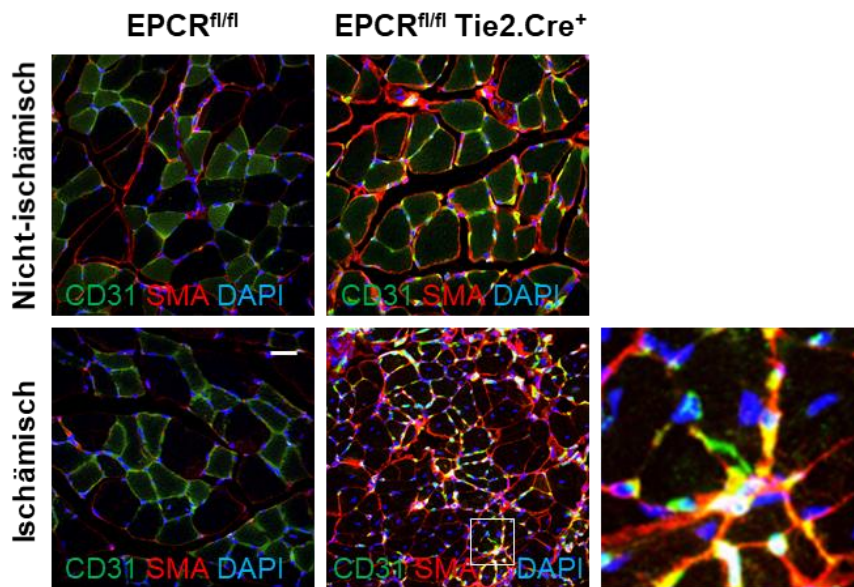


**Abbildung 14: Darstellung und Quantifizierung von p53-immunpositiven Zellen als Marker für apoptotische Zellen im Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen**

(A) Repräsentative Confocal-Bilder der p53 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von apoptotischen Zellen in Gewebeschnitten des ischämischen und nicht-ischämischen *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren und deren EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Wurfgeschwistern. In Grün sind p53-immunpositive Zellen dargestellt, in Blau die Zellkerne (DAPI). Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der p53-immunpositiven Zellen pro Muskelfaser von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=10) und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=10) Mäusen. \*\*\*\*P<0,0001 vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf, ####P<0,0001 vs. Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

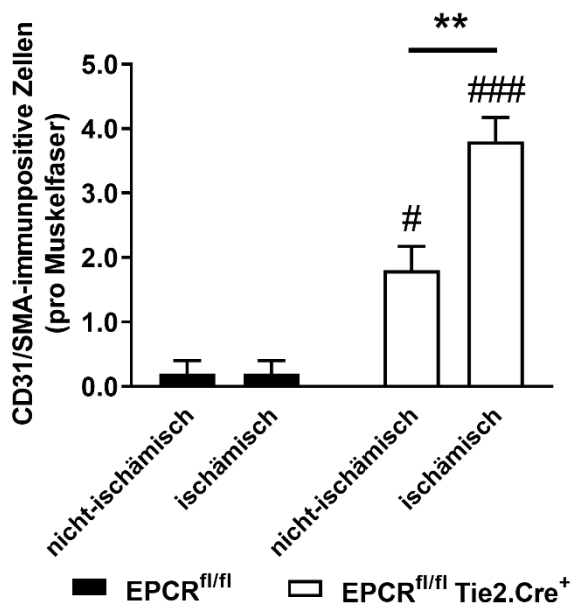
#### 4.5.5 Histochemische Analysen von endothelialer-zu-mesenchymaler-Transition

In zwei weiteren Immunfluoreszenzfärbungen wurde der Frage nachgegangen, ob es durch die induzierte, einseitige Ischämie zu einer Umwandlung von endothelialen in mesenchymale Zellen in der Muskulatur der Hinterläufe der Mäuse gekommen ist und wie dieser Vorgang durch das Fehlen von EPCR beeinflusst wird. Dieser Prozess wird als endotheliale-zu-mesenchymale-Transition (EndMT) bezeichnet. Hierfür wurden Gewebeschnitte des *M. gastrocnemius* mit dem endothelialen Marker CD31 und den mesenchymalen Markern *Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin* (SMA) oder *Platelet-Derived Growth Factor Receptor beta* (PDGFR $\beta$ ) angefärbt. Repräsentative Confocal-Bilder der beiden Färbungen zeigen die **Abbildungen 15 und 17**. Ein möglicher erster Hinweis, dass der Prozess der EndMT stattgefunden hat, sind doppelt positive Zellen in Gelb, die sowohl CD31 als auch SMA bzw. PDGFR $\beta$  exprimieren. Die Quantifizierungen in den **Abbildungen 16 und 18** zeigen, dass die EndMT vermehrt im ischämischen Hinterlauf von Mäusen der Gruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> aufgetreten ist. Dort konnten  $3,80 \pm 0,37$  (MW  $\pm$  SEM) CD31/SMA doppelt immunpositive Zellen pro Muskelfaser ermittelt werden. Dies sind signifikant mehr, vergleicht man es mit dem nicht-ischämischen Hinterlauf derselben Mauslinie ( $1,8 \pm 0,37$  (MW  $\pm$  SEM)) bzw. mit der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>. Die Ergebnisse der CD31/ PDGFR $\beta$  Färbung stellten sich ähnlich dar. Die meisten Zellen, die sowohl den endothelialen Marker als auch den mesenchymalen Marker exprimiert hatten, wurden ebenfalls im ischämischen Hinterlauf der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> quantifiziert.



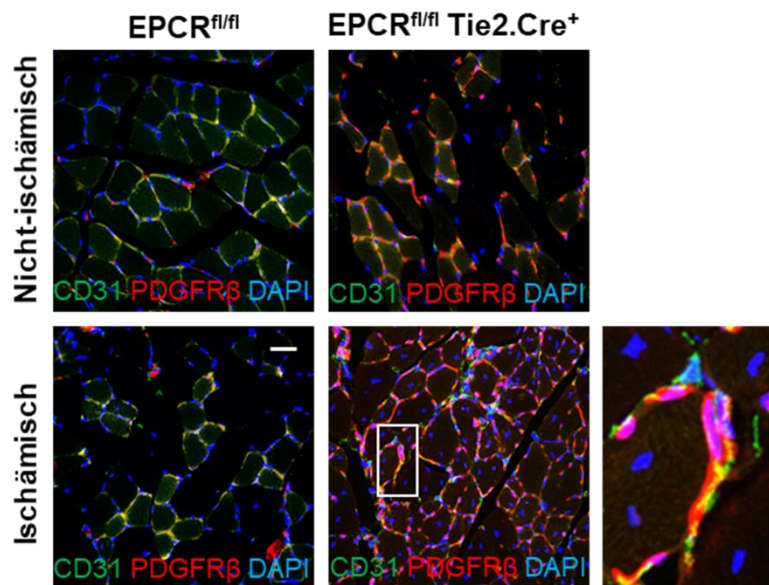
**Abbildung 15: CD31/SMA doppelt immunpositive Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT**

Repräsentative Confocal-Bilder der CD31/SMA Immunfluoreszenzfärbung auf Gewebeschnitten des ischämischen und nicht-ischämischen *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäusen und deren EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Wurfgeschwistern. In Grün sind CD31-immunpositive Zellen dargestellt, in Rot SMA-immunpositive Zellen und in Blau die Zellkerne (DAPI). Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. In der Vergrößerung sind CD31/SMA doppelt positive Zellen in Gelb zu sehen.



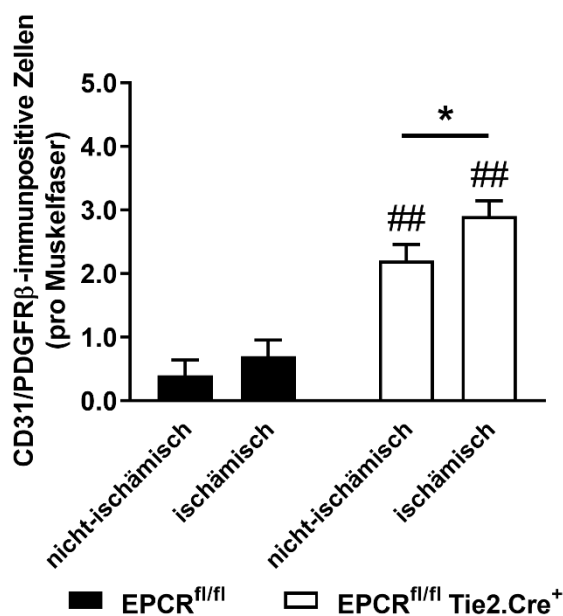
**Abbildung 16: Quantifizierung der CD31/SMA doppelt immunpositiven Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT**

Die Ergebnisse sind dargestellt pro Muskelfaser von EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäusen (n=5) und deren EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=5) Wurfgeschwistern. Gezeigt sind jeweils der nicht-ischämische und der ischämische Hinterlauf. \*\*P<0,01 vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf, #P<0,05 und ###<0,001 vs. Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.



**Abbildung 17: CD31/PDGFR $\beta$  doppelt immunpositive Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT**

Repräsentative Confocal-Bilder der CD31/PDGFR $\beta$  Immunfluoreszenzfärbung auf Gewebeschnitten des ischämischen und nicht-ischämischen *M. gastrocnemius* von *EPCR<sup>fl/fl</sup>* Mäusen und deren *EPCR<sup>fl/fl</sup> Tie2.Cre<sup>+</sup>* Wurfgeschwistern. In Grün sind CD31-immunpositive Zellen dargestellt, in Rot PDGFR $\beta$ -immunpositive Zellen und in Blau die Zellkerne (DAPI). Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. In der Vergrößerung sind CD31/PDGFR $\beta$  doppelt positive Zellen in Gelb zu sehen.

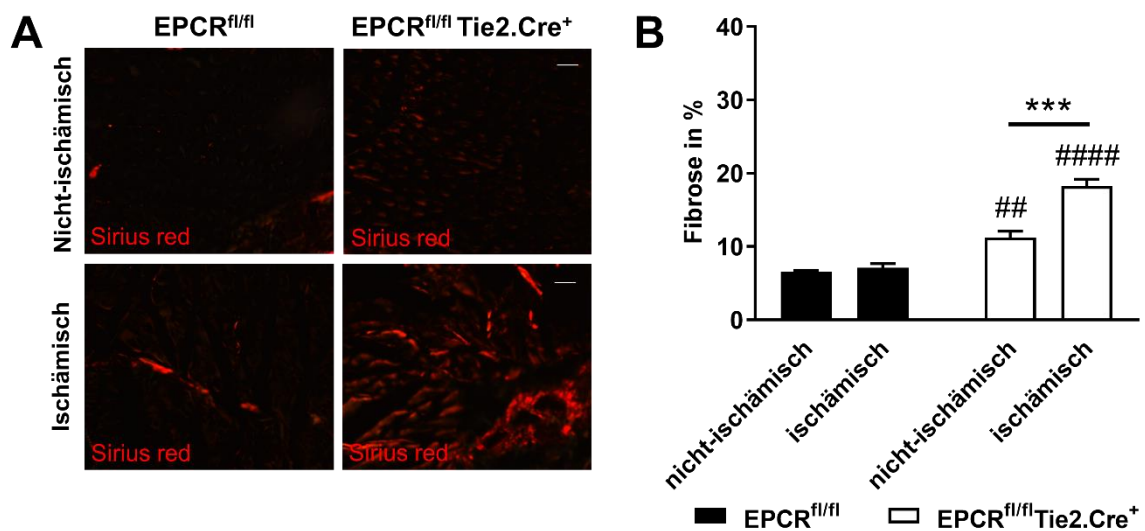


**Abbildung 18: Quantifizierung der CD31/PDGFR $\beta$  doppelt immunpositiven Zellen als Hinweis für den Prozess der EndMT**

Die Ergebnisse sind dargestellt pro Muskelfaser von *EPCR<sup>fl/fl</sup>* Mäusen ( $n=5$ ) und deren *EPCR<sup>fl/fl</sup> Tie2.Cre<sup>+</sup>* ( $n=5$ ) Wurfgeschwistern. Gezeigt sind jeweils der nicht-ischämische und der ischämische Hinterlauf. \* $P<0,05$  vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf, ## $<0,01$  vs. Kontrollgruppe *EPCR<sup>fl/fl</sup>*. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### 4.5.6 Histochemischer Fibrose-Nachweis mittels Siriusrot und Polarisationsmikroskopie

Mit Hilfe der histologischen Siriusrot-Färbung konnten wir Kollagenfasern als Zeichen der Fibrose im *M. gastrocnemius* von  $EPCR^{fl/fl}$  und  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Mäusen nachweisen. In **Abbildung 19A** sind repräsentative mikroskopische Bilder zur Visualisierung der Kollagenfasern in Rot dargestellt. Die Quantifizierung in **Abbildung 19B** zeigt keine relevanten Unterschiede in der Menge an nachgewiesenen Kollagenfasern im rechten und linken Hinterlauf von  $EPCR^{fl/fl}$  Mäusen. Im nicht-ischämischen Bein stellten sich durchschnittlich  $6,57 \pm 0,22$  % (MW  $\pm$  SEM) Fibrose dar, im ischämischen Bein waren es  $7,12 \pm 0,55$  % (MW  $\pm$  SEM) Fibrose. Bei  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Mäusen konnte eine signifikante Zunahme an Kollagenfasern im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Im linken, nicht-ischämischen Hinterlauf konnten im Durchschnitt  $11,3 \pm 0,85$  % (MW  $\pm$  SEM) Fibrose quantifiziert werden, im rechten, ischämischen Hinterlauf signifikant mehr mit  $18,3 \pm 0,95$  % (MW  $\pm$  SEM) Fibrose.

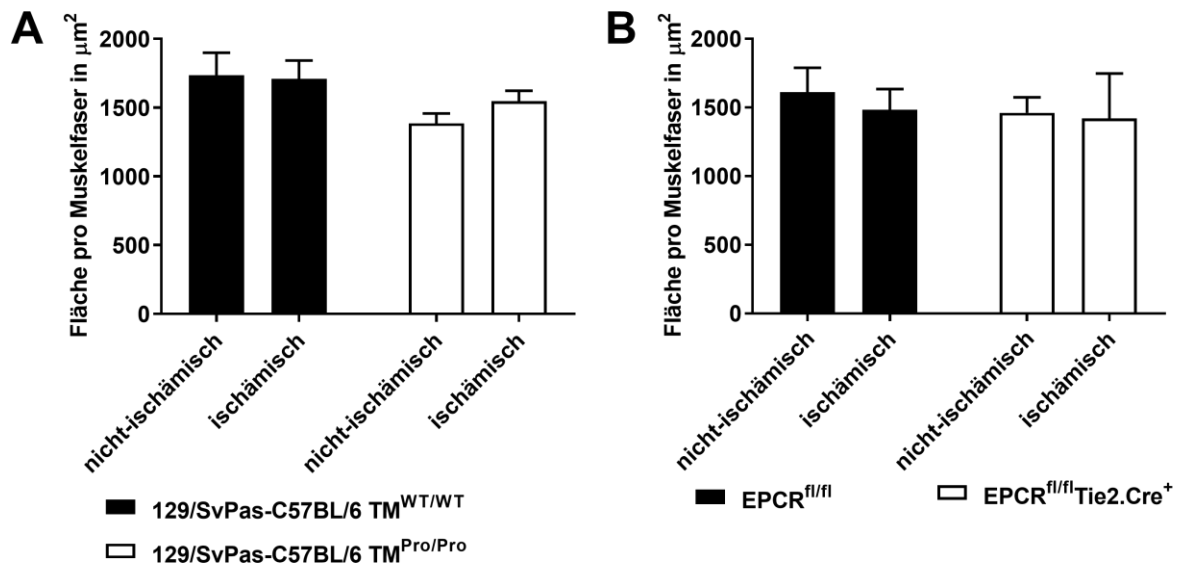


**Abbildung 19: Darstellung von Kollagenfasern und deren Quantifizierung als Zeichen von Fibrose**

(A) Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Bilder der Siriusrot-Färbung auf Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius* zur Darstellung von Kollagenfasern in Rot unter polarisierendem Licht. Gezeigt ist jeweils der ischämische und nicht-ischämische Hinterlauf von  $EPCR^{fl/fl}$  Mäusen und deren  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Wurfgeschwistern. Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. (B) Die Ergebnisse der Quantifizierung der Siriusrot-Färbung sind dargestellt als Fibrose in % von  $EPCR^{fl/fl}$  (n=4) und  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  (n=4) Mäusen. Gezeigt sind jeweils der nicht-ischämische und der ischämische Hinterlauf. \*\*\*P < 0,001 vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf, ##P < 0,01 und #####P < 0,0001 vs. Kontrollgruppe  $EPCR^{fl/fl}$ . Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### 4.5.7 Histochemische Visualisierung der Muskelfasern mittels *Wheat Germ Agglutinin*

Der nun folgenden Abschnitt befasst sich mit der Fragestellung, ob Unterschiede in der Fläche der einzelnen Muskelfasern zwischen den verschiedenen Mauslinien vorlagen. Diese hätten die Bestimmung der Zellzahl pro mm<sup>2</sup> Gesichtsfeld beeinflussen können. Mittels der *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) Fluoreszenzfärbung konnten die Zellmembranen und damit die einzelnen Muskelfasern des *M. gastrocnemius* bei Tieren der Mausgruppen 129/SvPas-C57BL/6 TM<sup>WT/WT</sup>, 129/SvPas-C57BL/6 TM<sup>Pro/Pro</sup>, EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> visualisiert werden und anschließend die Fläche pro Muskelfaser in µm<sup>2</sup> ermittelt werden. **Abbildung 20A** zeigt die quantitativen Ergebnisse dieser Untersuchung in Mäusen der Gruppen 129/SvPas-C57BL/6 TM<sup>WT/WT</sup> und TM<sup>Pro/Pro</sup>. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Muskelfasern des linken, nicht operierten Hinterlaufs von TM<sup>WT/WT</sup> Mäusen waren im Durchschnitt 1736 ± 164 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM) groß, die des rechten, operierten Hinterlaufs 1710 ± 134 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM). Bei Mäusen der Gruppe TM<sup>Pro/Pro</sup> wurden leicht niedrigere Werte ermittelt, im linken Hinterlauf durchschnittlich 1385 ± 72,7 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM) und im rechten Hinterlauf 1548 ± 75,3 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM). **Abbildung 20B** zeigt die Quantifizierung der Mauslinien EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup>. Auch hier konnten keine signifikanten Größenunterschiede der Muskelfasern festgestellt werden. Bei Tieren der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup> waren die Muskelfasern der nicht-ischämischen Hinterläufe im Durchschnitt 1611 ± 178 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM) groß, die der ischämischen Hinterläufe 1485 ± 149 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM). Bei der Mausgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> konnte im nicht-ischämischen Hinterlauf durchschnittlich eine Größe von 1461 ± 113 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM) pro Muskelfaser errechnet werden, kontralateral im ischämischen Hinterlauf von 1422 ± 327 µm<sup>2</sup> (MW ± SEM).



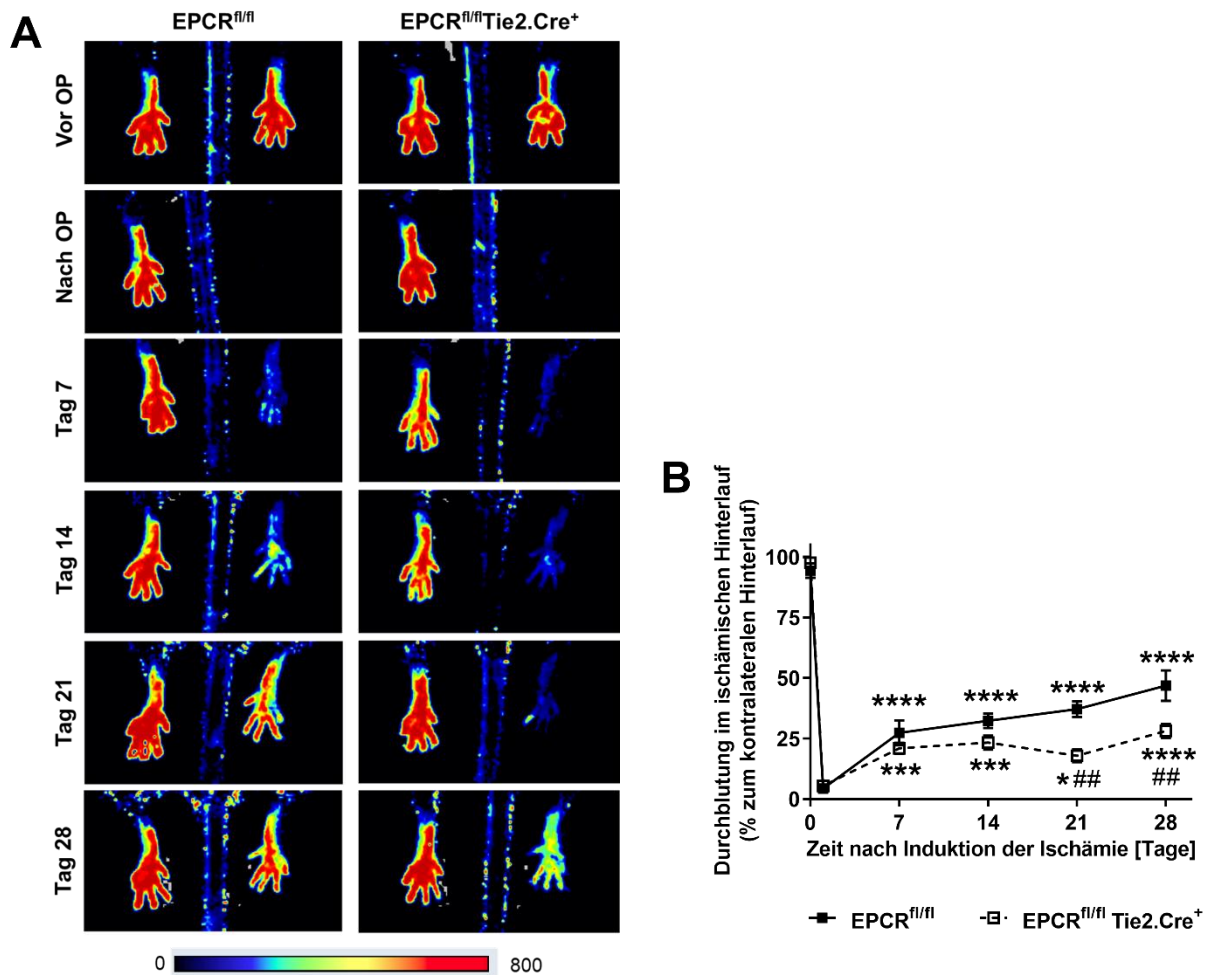
**Abbildung 20: Wheat Germ Agglutinin (WGA) Fluoreszenzfärbung zur Ermittlung der Muskelfaserfläche in  $\mu\text{m}^2$**

**(A)** Quantitative Analyse der Fläche pro Muskelfaser in  $\mu\text{m}^2$  von 129/SvPas-C57BL/6  $TM^{WT/WT}$  ( $n=4$ ) und  $TM^{Pro/Pro}$  ( $n=5$ ) Mäusen. Dargestellt sind jeweils der nicht-ischämische und der ischämische Hinterlauf.  
**(B)** Quantitative Analyse der Fläche pro Muskelfaser in  $\mu\text{m}^2$  von  $EPCR^{fl/fl}$  ( $n=4$ ) und  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  ( $n=3$ ) Mäusen. Dargestellt sind jeweils der nicht-ischämische und der ischämische Hinterlauf. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### **4.6 Das Fehlen von EPCR in Tie2-positiven Zellen reduziert die Wiederherstellung der Perfusion nach Ischämie**

Bei Mäusen der Gruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> wurde ebenfalls die Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.4) und die Perfusion im weiteren Versuchsablauf mittels der nicht-invasiven LDPI Messung ermittelt. Betrachtet man die repräsentativen LDPI-Bilder, die in **Abbildung 21A** gezeigt sind, lassen sich deutliche Unterschiede in der Wiederherstellung der Durchblutung zwischen EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen erkennen. Die Unterschiede sind besonders an Tag 21 und 28 postoperativ zu sehen. Mäuse, denen EPCR auf Tie2.Cre exprimierenden Zellen fehlte, zeigten eine deutlich reduzierte Wiederherstellung der Durchblutung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die in **Abbildung 21B** dargestellte quantitative Analyse der LDPI Messung veranschaulicht die Ergebnisse grafisch. Stellt man das LDPI Signal als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf in Prozent zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein dar, erreichten die Kontrolltiere an Tag 21 durchschnittlich 37,1 % und an Tag 28 46,9 %. Bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen lagen jeweils signifikant niedrigere Werte vor, und zwar an Tag 21 nur 17,9 % und an Tag 28 28,1 %.

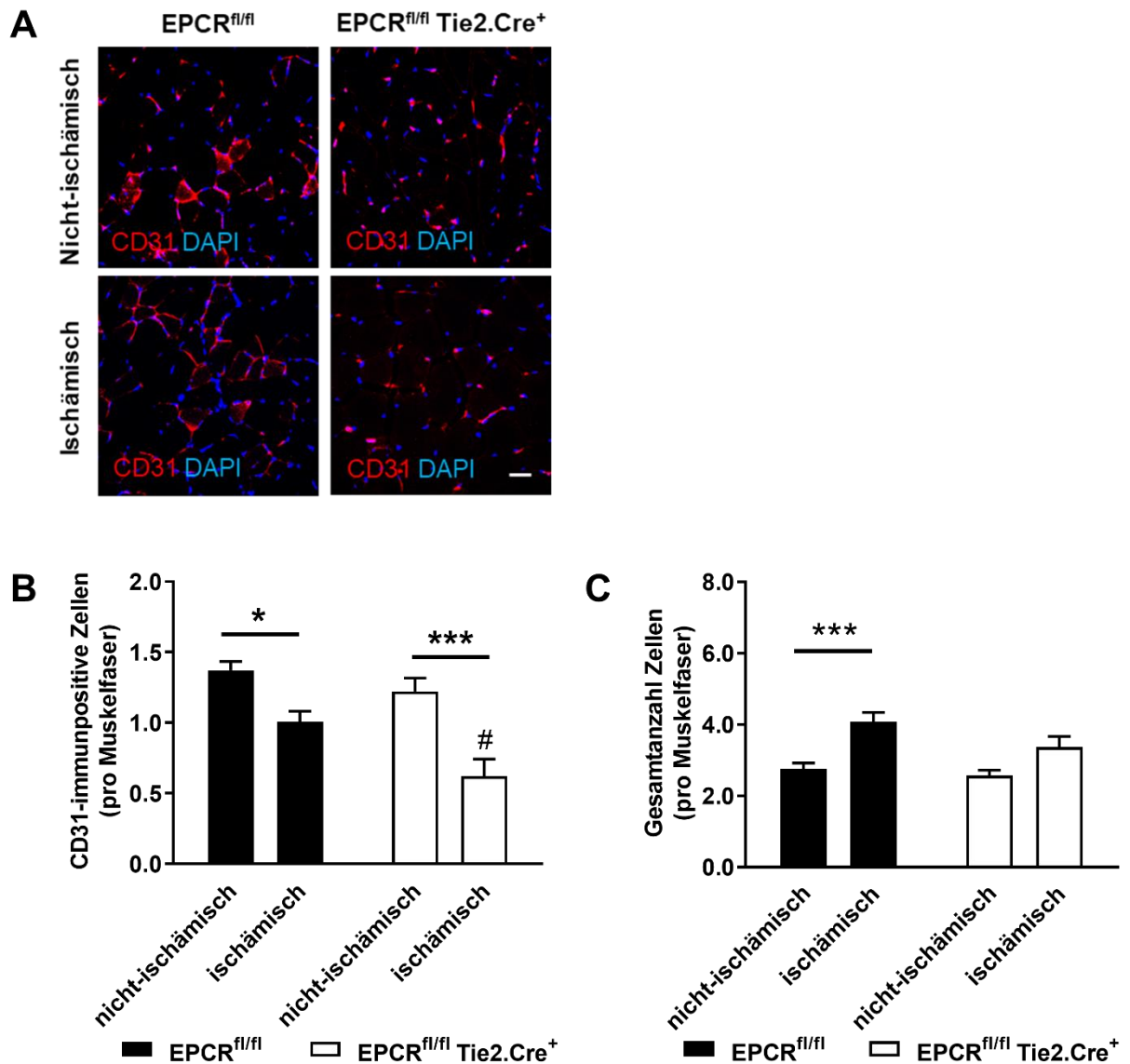




**Abbildung 21: Reduzierte Gefäßneubildung nach Ischämie bei Mäusen, denen EPCR in Tie2.Cre exprimierenden Zellen fehlt.**

(A) Repräsentative Bilder der nicht-invasiven LDPI Messung bei EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen. Gezeigt sind jeweils der linke und rechte Hinterlauf, gemessen direkt vor und nach der Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. (B) Quantitative Analyse des LDPI Signals von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=10) und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=11) Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf verglichen in % zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messung waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 und \*\*\*\*P<0,0001 vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe, ###P<0,01 vs. Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup> zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test erhoben.

Die deutlich reduzierte Gefäßneubildung bei Tieren der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> zeigt sich auch histologisch anhand der Immunfluoreszenzfärbung in **Abbildung 22A**, bei der CD31-immunpositive Endothelzellen in Rot und DAPI-positive Zellkerne in Blau auf Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius* dargestellt sind. Die repräsentativen Confocal-Bilder veranschaulichen sowohl bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> als auch bei EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäusen eine reduzierte Anzahl an Endothelzellen im ischämischen Hinterlauf verglichen mit dem jeweiligen nicht-ischämischen Hinterlauf. Die quantitative Analyse in **Abbildung 22B** bestätigt die Beobachtungen. Bei den Kontrolltieren ließen sich im linken, nicht operierten Bein  $1,37 \pm 0,06$  (MW  $\pm$  SEM) CD31-immunpositive Zellen pro Muskelfaser ermitteln, im rechten, operierten Bein hingegen signifikant weniger, nur  $1,0 \pm 0,07$  (MW  $\pm$  SEM). Bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied, hier konnten im nicht-ischämischen Hinterlauf  $1,22 \pm 0,09$  (MW  $\pm$  SEM) und im ischämischen Hinterlauf  $0,62 \pm 0,12$  (MW  $\pm$  SEM) Endothelzellen pro Muskelfaser gezählt werden. Neben der Betrachtung der Anzahl an CD31-immunpositiven Zellen wurde bei beiden Mausgruppen auch die Gesamtzellzahl pro Muskelfaser anhand der Zellkerne quantifiziert. Die quantitative Analyse, gezeigt in **Abbildung 22C**, ergab bei beiden Gruppen eine erhöhte Gesamtzellzahl im ischämischen Hinterlauf verglichen mit dem jeweiligen nicht-ischämischen Hinterlauf. Bei EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäusen ergab sich ein signifikanter Unterschied,  $2,76 \pm 0,16$  (MW  $\pm$  SEM) Zellen pro Muskelfaser im unverletzten Bein und  $4,07 \pm 0,27$  (MW  $\pm$  SEM) im operierten Bein. Bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, die Gesamtzellzahl lag bei  $2,57 \pm 0,15$  (MW  $\pm$  SEM) im nicht-ischämischen und  $3,38 \pm 0,29$  (MW  $\pm$  SEM) im ischämischen Hinterlauf.

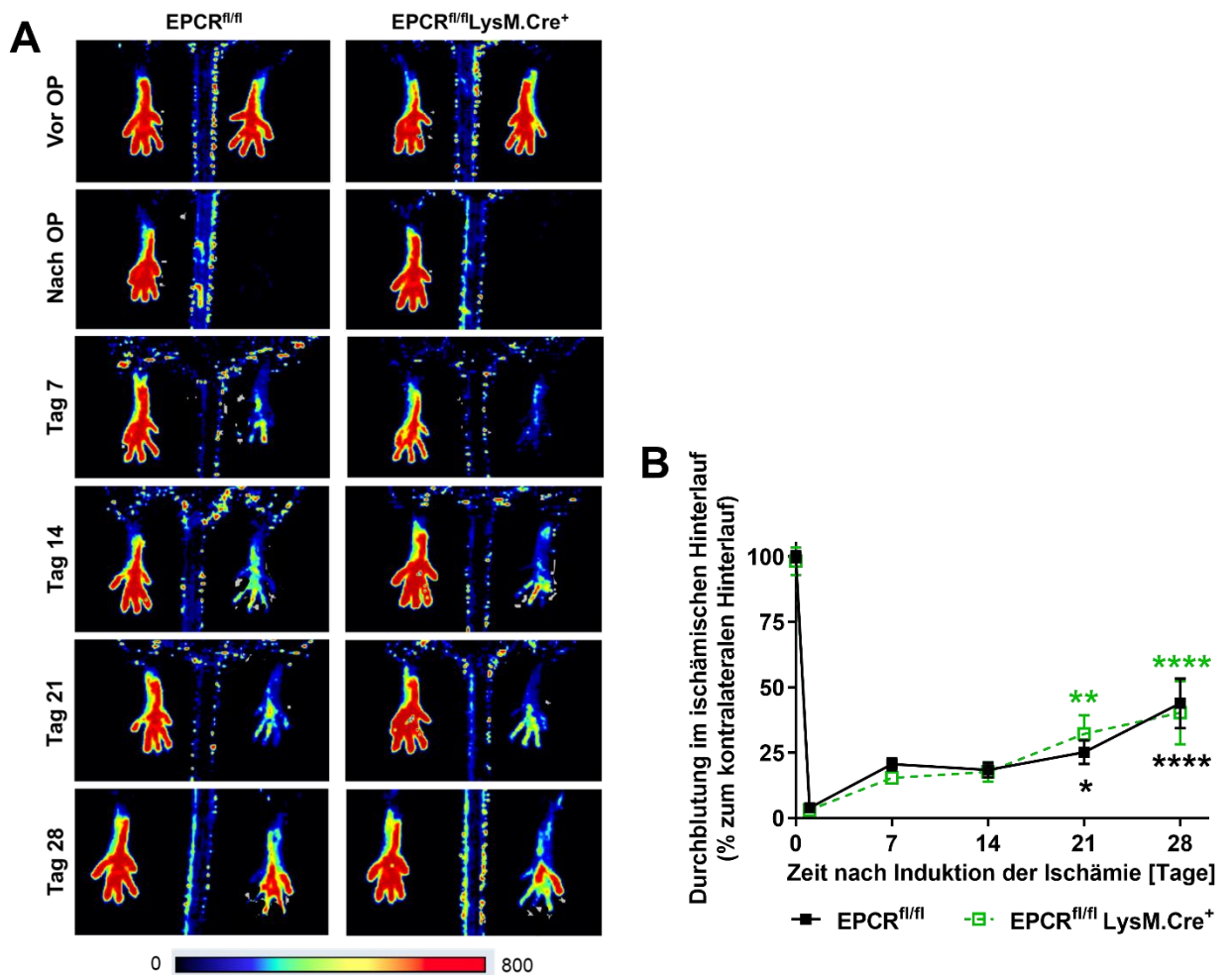


**Abbildung 22: Darstellung und Quantifizierung von CD31-immunpositiven Zellen sowie der Gesamtzellzahl bei EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup> Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen**

(A) Repräsentative Confocal-Bilder der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von CD31-immunpositiven Endothelzellen (rot) und Zellkernen (DAPI; blau) auf Gewebeschnitten des *M. gastrocnemius* von EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen und deren EPCR<sup>fl/fl</sup> Wurfgeschwistern. Dargestellt ist jeweils der nicht-ischämische und der ischämische Hinterlauf. Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m. (B) Dargestellt ist das Ergebnis der Quantifizierung von CD31-immunpositiven Zellen pro Muskelfaser im ischämischen und nicht-ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=7) und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=7) Mäusen. \*P<0,05 und \*\*\*P<0,001 vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf, #P<0,05 vs. Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup>. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt. (C) Dargestellt ist das Ergebnis der Quantifizierung der Gesamtzellzahl pro Muskelfaser im ischämischen und nicht-ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=16) und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> (n=12). \*\*\*P<0,001 vs. dem nicht-ischämischen Hinterlauf. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test ermittelt.

#### **4.7 Das Fehlen von EPCR in LysM.Cre-positiven myelomonozytären Zellen hat keine Auswirkungen auf die Wiederherstellung der Durchblutung nach Ischämie**

Da EPCR durch die Tie2.Cre-Rekombinase sowohl auf Endothelzellen als auch auf myeloischen und hämatopoetischen Zellen deletiert werden kann, betrachteten wir in einem nächsten Schritt die Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup>. Im Gegensatz zur Tie2.Cre-Rekombinase wird die LysM.Cre-Rekombinase ausschließlich auf myeloischen Zellen exprimiert und somit auch nur dort EPCR deletiert, EPCR auf Endothelzellen bleibt unbeeinflusst. Die Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> wurde uns von ... zur Verfügung gestellt. EPCR<sup>fl/fl</sup> Wurfgeschwister dienten uns als Kontrollgruppe. Ebenso wie bei den Tieren der bisherigen Mauslinien wurden auch diese Mäuse einer Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie unterzogen (siehe Abschnitt 3.2.4) und im Anschluss die Durchblutung mittels der nicht-invasiven LDPI Messung über einen Zeitraum von 28 Tagen ermittelt. Wie anhand der repräsentativen LDPI-Bilder in **Abbildung 23A** zu erkennen ist, zeigte sich bei EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> Mäusen eine ähnliche Reperfusion wie bei deren EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren. Die in **Abbildung 23B** gezeigte quantitative Analyse der LDPI Messung stellt die Ergebnisse grafisch dar. Stellt man das LDPI Signal als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf in Prozent zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein dar, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup> bis einschließlich Tag 28 erkannt werden. An Tag 28 erreichten EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> Mäuse durchschnittlich 40,3 %, bei Tieren der Mauslinie EPCR<sup>fl/fl</sup> waren es 43,9 %.



**Abbildung 23: Reperfusion nach Ischämie bei EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> Mäusen**

(A) Repräsentative Bilder der nicht-invasiven LDPI Messung, dargestellt von EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> Mäusen. Gezeigt sind jeweils der linke und rechte Hinterlauf, gemessen direkt vor und nach der OP zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. (B) Quantitative Analyse des LDPI Signals von EPCR<sup>fl/fl</sup> (n=7) und EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> (n=6) Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf verglichen in % zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messung waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*\*P<0,0001 vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test erhoben.

#### **4.8 Das Fehlen von PAR1 verzögert die Wiederherstellung der Gewebeperfusion nach Ischämie**

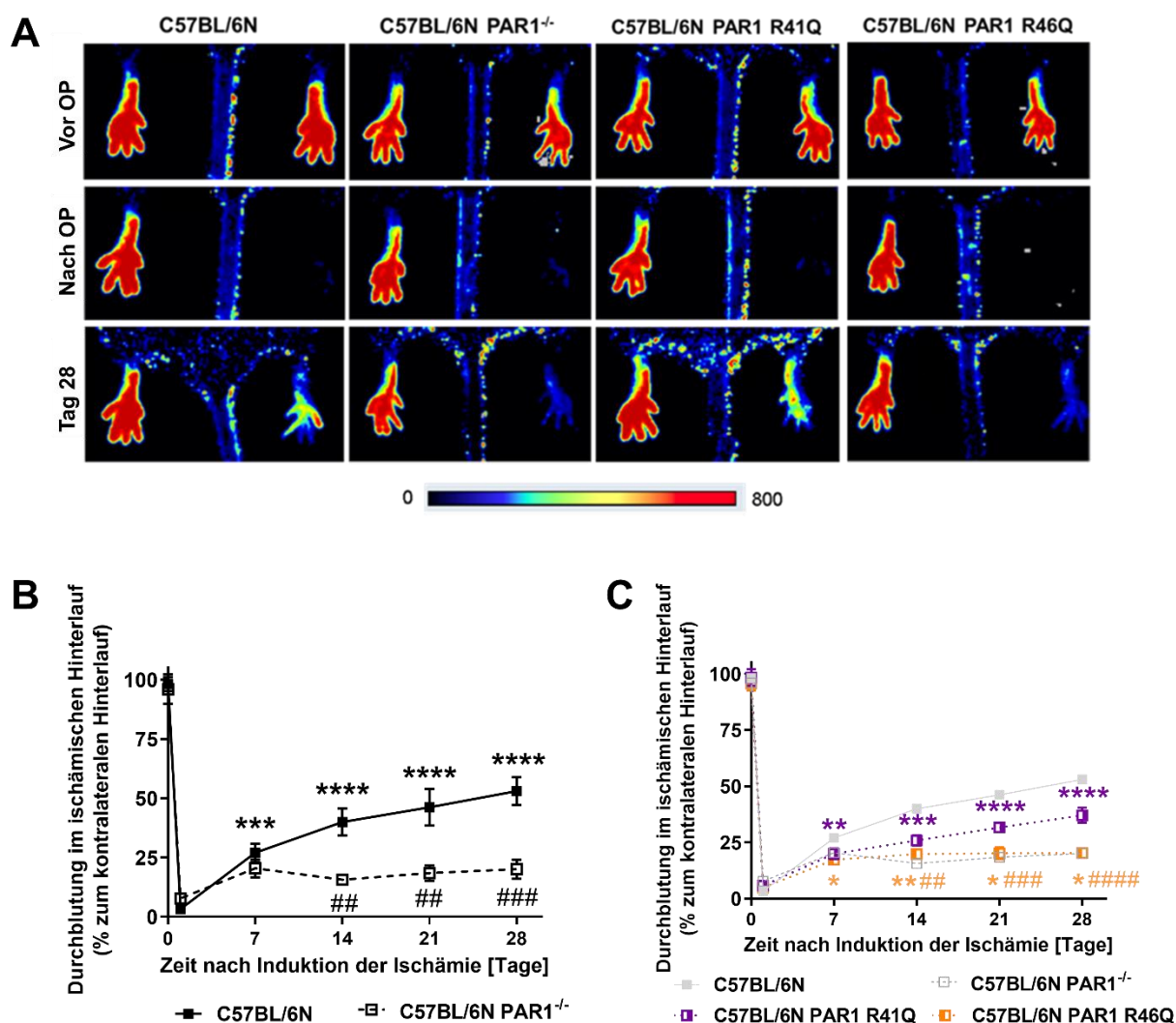
Nachdem wir den Einfluss von TM und EPCR auf die postischämische Wiederherstellung der Durchblutung näher untersucht hatten, betrachteten wir in einem weiteren Schritt den Protease-aktivierten Rezeptor 1. PAR1 ist ein Thrombin-Rezeptor auf der Oberfläche von Endothelzellen, der durch Bindung eines Liganden intrazelluläre Signalwege weiterleiten kann (118). Nicht nur Thrombin kann an PAR1 binden, sondern auch Aktiviertes Protein C (aPC) kann über die Bindung an EPCR die Signalwege des PAR1 beeinflussen (67). Um die Beteiligung von PAR1 an der Gefäßneubildung besser zu verstehen, untersuchten wir Mäuse, bei denen das PAR1 Gen durch eine Punktmutation deletiert war. Die genaue Charakterisierung dieser Mauslinie kann Abschnitt 3.2.2.3 entnommen werden. Die Mauslinie PAR1<sup>-/-</sup> wurde uns von ... zur Verfügung gestellt. Bei diesen PAR1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde ebenfalls eine einseitige Ligatur der *A. femoralis* durchgeführt, um eine Ischämie im rechten Hinterlauf der Mäuse zu induzieren (siehe Abschnitt 3.2.4). **Abbildung 24A** zeigt repräsentative Bilder der durchgeführten LDPI Messung. Darauf lässt sich eine deutlich eingeschränkte Reperfusion der PAR1<sup>-/-</sup> Mäuse verglichen mit den C57BL/6N Wildtyp Kontrollmäusen erkennen. **Abbildung 24B** stellt die Ergebnisse der LDPI Messung grafisch dar. Ab Tag 14 war die Reperfusion der PAR1<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6N Kontrollmäusen signifikant reduziert. Stellt man das LDPI Signal als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf in Prozent zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein dar, ergaben sich durchschnittlich folgende Werte: Tag 14 15,6 %, Tag 21 18,5 % und Tag 28 20,1 %. Bei den C57BL/6N Kontrollmäusen war die Reperfusion hingegen signifikant besser bei 39,9 % an Tag 14, 46,1 % an Tag 21 und 53,0 % an Tag 28.

Um die PAR1-vermittelte Signaltransduktion, ausgelöst durch Bindung von Thrombin bzw. von aPC weiter zu differenzieren, betrachteten wir in zwei weiteren Schritten die Durchblutung von C57BL/6N PAR1 R46Q und C57BL/6N PAR1 R41Q mutierten Mäusen. Auch hier dienten uns die C57BL/6N Wildtyp Mäuse als Kontrollgruppe. Die LDPI Messungen der beiden Mausgruppen ergaben deutliche Unterschiede in deren Durchblutung, repräsentative Bilder sind **Abbildung 24A** zu entnehmen, die dazugehörige Quantifizierung **Abbildung 24C**. Bei Tieren der Mauslinie PAR1 R41Q lag die Durchblutung im ischämischen Hinterlauf an Tag 28 bei durchschnittlich 37,1 % im Vergleich zum kontralateralen Bein, es ergab sich kein signifikanter Unterschied

## Ergebnisse

---

zu den C57BL/6N Kontrolltieren. Bei der Mausgruppe PAR1 R46Q zeigte sich hingegen eine signifikant schlechtere Reperfusion verglichen mit der Kontrollgruppe, an Tag 28 lag diese bei nur 20,3 % verglichen zum kontralateralen Bein. Somit lässt sich vermuten, dass die proangiogenetische Signaltransduktion über PAR1 vor allem durch aPC und weniger durch Thrombin vermittelt wird.



**Abbildung 24: Reperfusion nach Ischämie bei Mäusen mit fehlendem PAR1 Gen bzw. R41Q oder R46Q punktmutiertem PAR1 Gen**

(A) Repräsentative Bilder der nicht-invasiven LDPI Messung, dargestellt von C57BL/6N, C57BL/6N PAR1<sup>-/-</sup>, C57BL/6N PAR1 R41Q und C57BL/6N PAR1 R46Q Mäusen. Gezeigt sind jeweils der linke und rechte Hinterlauf, gemessen direkt vor und nach der OP zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 28 postoperativ. (B) Quantitative Analyse des LDPI Signals von C57BL/6N (n=12) und C57BL/6N PAR1<sup>-/-</sup> (n=9) Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf verglichen in % zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messung waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. \*\*\*P<0,001 und \*\*\*\*P<0,0001 vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe, ##P<0,01 und ###P<0,001 vs. Kontrollgruppe C57BL/6N zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test erhoben. (C) Quantitative Analyse des LDPI Signals von C57BL/6N (n=12), C57BL/6N PAR1<sup>-/-</sup> (n=9), C57BL/6N PAR1 R41Q (n=13) und C57BL/6N PAR1 R46Q (n=13) Mäusen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Durchblutung im ischämischen Hinterlauf verglichen in % zum kontralateralen, nicht-ischämischen Bein. Die Zeitpunkte der Messung waren direkt vor und nach der Operation zur Induktion der Ischämie sowie im weiteren Verlauf an Tag 7, 14, 21 und 28 postoperativ. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 und \*\*\*\*P<0,0001 vs. Werte direkt nach der Operation innerhalb der gleichen Mausgruppe, ##P<0,01, ###P<0,001 und ####P<0,0001 vs. Kontrollgruppe C57BL/6N zum gleichen Zeitpunkt. Die Daten wurden mittels des Two-Way ANOVA Tests gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test erhoben.



## **5 Diskussion**

Die Bildung neuer Blutgefäße stellt einen wichtigen physiologischen Prozess im Rahmen der Wundheilung, aber auch bei vielen Pathologien wie entzündlichen Prozessen oder Tumorleiden dar (1). Myokardinfarkt und Schlaganfall sind typische Erkrankungen, die aufgrund einer Gefäßstenose oder -okklusion entstehen und deren hypoxische Folgeschäden durch eine suffiziente Gefäßneubildung verhindert bzw. vermindert werden können. Daher sind neue Erkenntnisse hinsichtlich der Mechanismen, welche den protektiven und regenerativen Einflüssen von Endothelzellen zugrunde liegen und eine entscheidende Rolle im Prozess der Angiogenese spielen, von hoher Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen, aber auch für ischämische und thrombotische Ereignisse.

In der vorliegenden Studie haben wir anhand verschiedener, genetisch veränderter Mauslinien in vivo den Einfluss des Thrombomodulin-EPCR-PAR1 Systems auf die Wiederherstellung der Gewebepерfusion durch die Neubildung von Gefäßen nach einer einseitig induzierten Hinterlauf-Ischämie näher betrachtet. Hierbei konnten wir eine entscheidende Rolle der EPCR-aPC-PAR1 Signalübertragung für regenerative Angiogenese Prozesse erkennen.

### **5.1 Vermehrte Thrombin Expression in Thrombomodulin-mutierten Mäusen fördert die Gefäßneubildung nach Ischämie**

Endothelzellen besitzen antikoagulatorische Eigenschaften, welche neben dem hemmenden Einfluss auf die Aktivierung von Blutplättchen vorwiegend durch die Expression verschiedener Proteine auf ihrer luminalen Oberfläche vermittelt werden (2). Thrombomodulin (TM) ist ein entscheidendes endotheliales Glykoprotein, welches durch die Bindung des Gerinnungsfaktors Thrombin dessen koagulatorische Eigenschaften inhibiert und gleichzeitig die Aktivierung von Protein C fördert (5). Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass Mutationen im TM Gen einen wichtigen Einfluss auf die Blutgerinnung nehmen und eine erniedrigte TM Expression zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Thromben sowie für das Auftreten von Myokardinfarkten führen kann (9, 10, 56). Gleichzeitig weisen bestimmte Abschnitte oder Untereinheiten im TM-Gen unter anderem proangiogenetische Effekte auf Endothelzellen sowie deren Vorläuferzellen auf (43, 119). Durch seine wichtigen Effekt auf die Blutgefäßneubildung hat TM eine kritische Bedeutung während der Embryogenese, wie anhand experimenteller Mausversuche gezeigt wurde (120).

Die zu Beginn in unserer Studie verwendete  $TM^{Pro/Pro}$  Mauslinie ahmt den Zustand der endothelialen Dysfunktion oder Schädigung nach, indem eine Punktmutation des TM Gens zu einer deutlich reduzierten Hemmung von Thrombin sowie zur eingeschränkten Generierung von aktiviertem Protein C (aPC) führt (108). Bei 129/SvPas-C57BL6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen mit einem gemischt-genetischen Hintergrund zeigte sich anhand der nicht-invasiven *Laser Doppler Perfusion Imaging* Methode im Anschluss an eine Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlauf-Ischämie eine gesteigerte Reperfusion im Vergleich zu den  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltieren (**Abbildung 5**). Zusätzlich stellte sich anhand der vermehrten Expression von CD31-immunpositiven Zellen, welche als Marker für Endothelzellen dienen, eine erhöhte Dichte an Kapillaren dar (**Abbildungen 6 und 7**). Die Gesamtzellzahl zeigte sich bei 129/SvPas-C57BL6  $TM^{Pro/Pro}$  und  $TM^{WT/WT}$  Mäusen ähnlich, jeweils vermehrt im ischämischen verglichen mit dem nicht-ischämischen Hinterlauf.

CD31 (*Cluster of Differentiation 31*), auch als PECAM 1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*, Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1) bezeichnet, ist ein transmembranes Glykoprotein, welches neben der Expression auf frühen und reifen Endothelzellen auch auf Thrombozyten, Neutrophilen, Leukozyten, Megakaryozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden kann (121-123). Andere Endothelzellen-Marker sind unter anderem das *tight junction* Protein VE-Cadherin und vWF, welcher jedoch vorwiegend auf reifen Endothelzellen exprimiert wird (in Weibel-Palade-Körperchen) und auch in den  $\alpha$ -Granula von Blutplättchen nachweisbar ist, sowie CD34, welcher vor allem auf Endothelvorläuferzellen nachweisbar ist.

Wie bereits bei anderen Krankheitsmodellen gezeigt wurde, könnte die erhöhte Thrombin Expression der  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse für die vermehrte Gefäßneubildung verantwortlich sein (124). Durch die Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors 1 (PAR1) induziert Thrombin unter anderem eine Hochregulierung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF; *Vascular Endothelial Growth Factor*), Angiopoetin-2 und Fibroblasten Wachstumsfaktor 1 (FGF1, *Fibroblast Growth Factor 1*) (88, 125) sowie eine Herunterregulierung des *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ )-Rezeptors, welcher die Proliferation von Endothelzellen hemmt (126). Dadurch werden die proangiogenetischen Eigenschaften von Endothelzellen gefördert und der Prozess der Gefäßneubildung durch den Einfluss des Thrombins unterstützt (92, 127). Gleichzeitig gibt es Hinweise darauf, dass zu hohe Thrombin

Konzentrationen aufgrund einer möglichen Herunterregulierung des Thrombin Rezeptors zu einer Umkehr der proangiogenetischen Eigenschaften führen können und somit die Angiogenese gehemmt wird (92). In höherer Konzentration bindet Thrombin auch an andere PARs, unter anderem an den vorwiegend auf Plättchen exprimierten PAR4. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe (nicht Teil der vorliegenden Arbeit) in PAR4<sup>-/-</sup> Mäusen keine Auswirkungen auf die Angiogenese nach Ischämie gefunden wurden. Auch für den auf Endothelzellen exprimierten PAR3 wurden keine Unterschiede gefunden, während PAR2 primär nicht von Thrombin aktiviert wird. Zusätzlich neben dem PAR1-vermittelten Einfluss des Thrombins auf die Gefäßneubildung sollte bedacht werden, dass auch andere, PAR1-unabhängige Signalwege an diesem Prozess beteiligt sein könnten. So ist Thrombin durch proteolytische Spaltung des auf Endothelzellen exprimierten Moleküls Jagged1 in der Lage, die Freisetzung des proangiogenetischen FGF1 direkt zu fördern (128). Des Weiteren begünstigt Thrombin die Expression des Integrins  $\alpha\beta 3$ , welches als endothelialer Rezeptor unter anderem für vWF, Fibrin und Fibronectin dient und als Marker für angiogenetische Vorgänge gesehen werden kann (129, 130).

### **5.2 Der proangiogenetische Phänotyp der Mäuse mit einer Punktmutation im Thrombomodulin-Gen zeigt sich nur in Kombination mit vermehrter endothelialer EPCR Expression**

Bereits frühere Studien zeigten, dass genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Mauslinien hinsichtlich der phänotypischen Ausprägung von Mutationen des TM Gens von Bedeutung sind (109). Die von uns untersuchten C57BL/6J TM<sup>Pro/Pro</sup> und C57BL/6N TM<sup>Pro/Pro</sup> Mäuse zeigten nach einseitig induzierter Hinterlauf-Ischämie jeweils eine ähnliche Wiederherstellung der Durchblutung wie ihre Wildtyp Kontrolltiere. Stattdessen stellte sich, in Einklang mit anderen bereits durchgeführten Studien (131, 132), bei Mäusen mit einem C57BL/6J Hintergrund eine deutlich schnellere Reperfusion dar verglichen mit C57BL/6N Mäusen. C57BL/6J Mäuse besitzen eine Deletion des *nicotinamide nucleotide transhydrogenase (nnt)* Gens (133, 134). Nnt wird auf der inneren Membran von Mitochondrien exprimiert und ist an deren antioxidativer Wirkung beteiligt.

Mit Hilfe weiterer, in Abschnitt 4.3 beschriebenen Versuchen, konnten wir zeigen, dass der proangiogenetische Phänotyp der 129/SvPas-C57BL6 TM<sup>Pro/Pro</sup> Mäuse nur in

Kombination mit einer vermehrten EPCR Expression zu beobachten ist. In der Western Blot Analyse von Lungenhomogenat aus 129/SvPas-C57BL6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen zeigte sich eine intensive EPCR Bande. Mit Hilfe isolierter, primärer muriner pulmonaler Endothelzellen konnten wir die erhöhten EPCR Spiegel auf eine verstärkte EPCR Expression auf Endothelzellen zurückführen. Die alleinige Überexpression von EPCR bei intaktem TM-Gen, wie es bei 129SvPas-C57BL/6J Mäusen vorlag, war jedoch nicht ausreichend, um die Durchblutung im ischämischen Hinterlauf der Mäuse deutlich zu verbessern. Nur die Kombination aus einer vermehrten EPCR Expression mit einer Mutation des TM Gens, wie es bei den homozygoten 129/SvPas-C57BL6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen vorlag, führte zu einer signifikant gesteigerten Angiogenese im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der Annahme, dass die erhöhte Thrombin Konzentration der  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse einerseits direkte proangiogenetische Auswirkungen hat und andererseits zu einer ausreichenden Generierung von aPC führt, wodurch EPCR-abhängig die Neubildung von Blutgefäßen gefördert werden kann.

### 5.3 EPCR stellt entscheidenden Faktor im Prozess der Angiogenese dar

Die Annahme, dass EPCR eine wichtige Rolle in der Neubildung von Gefäßen zukommt, konnten wir mit Hilfe der Mauslinie  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  mit einem C57BL/6N genetischen Hintergrund bekräftigen. EPCR wird von einer Vielzahl von Zellen, welche an der Neubildung von Gefäßen beteiligt sind, exprimiert, darunter auch von Endothelzellen (135). EPCR kann vorwiegend auf der endothelialen Oberfläche in Arterien und Venen und weniger auf der in Kapillaren nachgewiesen werden (59). Dennoch stellte sich in unserem Mausmodell dar, dass das Vorhandensein von EPCR entscheidend für die post-ischämische Regenerierung neuer Kapillaren ist. Bei  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Mäusen, bei denen immunhistochemisch eine stark reduzierte endotheliale EPCR Expression nachweisbar war, zeigte sich eine signifikant verminderte Reperfusion der ischämischen Hinterlauf-Muskulatur verglichen mit den Kontrolltieren (**Abbildung 21**). Ebenso stellte sich eine verminderte Anzahl an Endothelzellen dar (**Abbildung 22**). Die Verwendung von Angiogenese Assays in weiteren Versuchen aus unserer Arbeitsgruppe (nicht gezeigt in der vorliegenden Arbeit) unterstützen die Ergebnisse. Sowohl ex vivo (anhand von Gewebeschnitten der Aorta) als auch in vitro (anhand isolierter, CD31-positiver Endothelzellen) konnten wir

bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen eine reduzierte Länge sowie eine reduzierte Anzahl neuer Gefäßsprosse zeigen.

EPCR besitzt antiinflammatorische Eigenschaften und kann auf verschiedenen Immunzellen nachgewiesen werden (136). In Mausstudien stellte sich eine Überexpression von EPCR als protektiv gegen septische und thrombotische Ereignisse dar (137). Dennoch ergab sich bei EPCR<sup>fl/fl</sup>LysM.Cre<sup>+</sup> Mäusen, bei denen eine genetische Deletion des EPCR auf myeloischen Zellen vorlag, keine Änderung der Gefäßneubildung unter ischämischen Bedingungen (**Abbildung 23**). Vergleicht man diese Ergebnisse mit der eingeschränkten Reperfusion von EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen, unterstützt dies die entscheidende Rolle der EPCR Expression auf Tie2-exprimierenden Endothelzellen im Prozess der Angiogenese. Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass die konstitutionelle Deletion des EPCR durch die Tie2.Cre-Rekombinase nicht nur Endothelzellen betrifft, sondern auch hämatopoetische Zellen betroffen sein können und Veränderungen in diesen somit ebenfalls die Gefäßneubildung beeinflussen könnten. Darüber hinaus besitzen endotheliale Vorläuferzellen, welche im Knochenmark vorhanden sind und zugleich frei im Blut zirkulieren, regenerative und proangiogenetische Eigenschaften (138, 139). EPCR kann als Marker für Stamm- und Vorläuferzellen der endothelialen Zellreihe angesehen werden, wird aber auch von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (83, 140). Die Interaktion von Thrombin mit PAR1 führt zu einer vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), wodurch die Abspaltung des EPCR von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark induziert und somit deren Mobilisierung gefördert wird (81). Hämatopoetische Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in die verschiedenen Zellen des blutbildenden Systems sowie in Endothelzellen (79).

#### **5.4 Die Angiogenese wird primär durch die aPC-vermittelte PAR1 Signalübertragung induziert**

Die vier Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR1-PAR4) können auf der Oberfläche verschiedener Zellen nachgewiesen werden, Endothelzellen beispielsweise exprimieren vorwiegend PAR1 und PAR2 (8, 65). Neben der entscheidenden Rolle in der intrazellulären Signalübertragung des proangiogenetischen Einflusses von Thrombin auf Endothelzellen ist PAR1 auch an der Vermittlung der zytoprotektiven Eigenschaften des aPC beteiligt. Durch Bildung eines Komplexes mit EPCR auf der Oberfläche von Endothelzellen ist aPC in der Lage, PAR1-abhängig antiinflammatorische, antiapoptotische und zytoprotektive Signalwege in Gang zu setzen (141, 142). Über denselben Mechanismus werden unter anderem auch die antientzündlichen und zytoprotektiven Eigenschaften des TM vermittelt, indem es die Bereitstellung des aPC durch Bildung eines Komplexes mit Thrombin verstärkt. TM besitzt sowohl eine aPC-vermittelte als auch eine direkte antientzündliche Wirkung (143). Die direkte Wirkung erfolgt durch Unterdrückung des Komplementsystems sowie von Endotoxinen, zusätzlich hemmt TM sogenannte *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) und *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs), welche das Auftreten einer Entzündungsreaktion unterstützen. Endothelzellen selbst können Entzündungszellen wie Leukozyten durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen sowie durch die Freisetzung von Zytokinen anlocken und via Diapedese in entzündliches Gewebe schleusen (45). An dieser Stelle sollte berücksichtigt werden, dass unsere Versuchsmäuse zur Schmerzlinderung postoperativ das Arzneimittel Metamizol erhalten haben. Metamizol wirkt primär analgetisch, antipyretisch und spasmolytisch, hat aber auch eine leichte antientzündliche Wirkung, welche Einfluss auf unsere Ergebnisse genommen haben könnte.

In der vorliegenden Studie konnten wir anhand der Mauslinie PAR1<sup>-/-</sup> zeigen, dass die globale Deletion von PAR1 mit einer stark reduzierten postischämischen Gewebereperfusion verbunden ist (**Abbildung 24**). In weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe war die Neubildung von Gefäßen hingegen unbeeinflusst von der Abwesenheit von PAR2 und PAR4. Andere Studien deuten darauf hin, dass sowohl die Thrombin-induzierte Signalübertragung durch PAR1 als auch die über PAR2, welche vor allem die zellulären Effekte von Faktor Xa sowie des Tissue Faktor–Faktor VIIa Komplexes vermittelt (8, 65), für die Neovaskularisation tumoröser Prozesse

mitverantwortlich sind (144, 145). Die hypoxiebedingte retinale Neubildung von Gefäßen stellte sich hingegen primär als Tissue Faktor-vermittelte PAR2 Signalübertragung dar (146). Auch Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche Protease-aktivierte Rezeptoren und können dadurch Einfluss auf die Angiogenese nehmen. PAR1 und PAR4 zeigen sich als mögliche Regulatoren der Freisetzung von pro- und antiangiogenetischen Faktoren aus den  $\alpha$ -Granula humaner Blutplättchen (147).

Weitere Ergebnisse unserer Studie deuten darauf hin, dass die Angiogenese in unserem Modell vorwiegend von der aPC-abhängigen PAR1 Aktivierung beeinflusst wird. C57BL/6N PAR1 R41Q Mäuse sind aufgrund einer Punktmutation des PAR1 Gens Thrombin-, Faktor Xa- und aPC-resistent. Die Spaltung des PAR1 durch Thrombin an Aminosäurestelle Arg41 induziert normalerweise proinflammatorische, prothrombotische und apoptotische Signalwege (72). C57BL/6N PAR1 R46Q Mäuse weisen eine Punktmutation des PAR1 Gens bei Arg46 auf, wodurch sie ausschließlich aPC-resistent sind und die aPC-vermittelten zellprotektiven Prozesse nicht in Gang gesetzt werden können (113). Die unterschiedlichen Stellen der proteolytischen Spaltung des PAR1 ermöglichen es, dass abhängig von der aktivierenden Protease gegensätzliche Signalwege durch denselben Rezeptor aktiviert werden können (70). Mäuse der C57BL/6N PAR1 R46Q Gruppe zeigten eine deutlich schlechtere Wiederherstellung der Gewebedurchblutung des ischämischen Hinterlaufs verglichen mit den C57BL/6N PAR1 R41Q Mäusen (**Abbildung 24**). Die Betrachtung von Explantaten der Aorta in weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe (nicht gezeigt in der vorliegenden Arbeit) zeigten zudem eine deutlich geringere Ausbildung neuer Gefäßsprosse bei PAR1 R46Q Mäusen.

In weiterführenden Experimenten konnten wir die Ergebnisse dieser Arbeit durch die Anwendung und Analyse von Angiogenese Assays ex vivo an Gewebeschnitten der Aorta bestätigen. Die Stimulation primärer Endothelzellen isoliert aus der Lunge von C57BL/6N Mäusen mit TR47 PAR1-basierten Peptiden, wodurch eine Spaltung des PAR1 durch aPC nachgeahmt wurde, bewirkte hinsichtlich der Anzahl und Länge neuer Gefäßsprosse ebenfalls eine deutlich stärkere Antwort im Vergleich zur Verwendung von Kontrollpeptiden oder TR41 PAR1-basierten Peptiden, welche die Aktivierung des PAR1 durch Thrombin imitierten.

Die demonstrierte Rolle der EPCR-aPC-PAR1 Signalübertragung im Prozess der ischämischen arteriellen Revaskularisation konnte auch in anderen Studien gezeigt

werden. Vermittelt durch PAR1 besitzt aPC neuroprotektive Eigenschaften und fördert die Neovaskularisation im Rahmen einer zerebralen Ischämie (77, 148). Darüber hinaus konnte eine aPC-abhängige verbesserte Durchblutung bei myokardialen und renalen ischämischen Ereignissen festgestellt werden (149, 150). Weitere Studien zeigten, dass aPC die Proliferation von Endothelzellen unter anderem durch die EPCR-vermittelte Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) sowie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) stimuliert (151). *Ubicha et al.* konnten die proangiogenetischen Eigenschaften des aPC mit Hilfe von murinen Hornhautexplantaten darstellen (152). Anhand unserer Ergebnisse lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass aPC auch durch andere Mechanismen, welche unabhängig der Spaltung des PAR1 sind, wie beispielsweise durch  $\beta$ -Arrestin-2, zytoprotektive Effekte vermittelt (153).

### **5.5 Das Fehlen von EPCR auf Tie2-exprimierenden Zellen führt zu vermehrter Gewebehypoxie, Entzündungsreaktion und Apoptose von Endothelzellen**

In Hinblick auf den wichtigen Einfluss des EPCR auf die Neubildung von Gefäßen untersuchten wir bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen sowie bei deren Kontrolltieren weitere zelluläre Veränderungen des *M. gastrocnemius* nach einseitig induzierter Ischämie und verwendeten dazu verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen.

Die Ergebnisse unserer Studie präsentieren eine signifikant erhöhte Anzahl an Makrophagen im ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen, verglichen mit den Ergebnissen der Quantifizierung der Kontrollgruppe EPCR<sup>fl/fl</sup> (**Abbildung 12**). Im Falle einer Gewebeschädigung kommt es durch die Freisetzung von sogenannten DAMPs und PAMPs aus absterbenden Zellen zu einer Entzündungsreaktion (154). Diese bewirkt unter anderem die Aktivierung der im Gewebe ansässigen Makrophagen, welche auf ihrer Oberfläche zahlreiche Rezeptoren exprimieren, wodurch sie die Signale von Pathogenen und absterbenden Zellen wahrnehmen können (155). Zusätzlich werden durch Chemokine vermittelt vermehrt Monozyten aus dem Knochenmark freigesetzt, welche die Vorläuferzellen der Makrophagen sind (155). Diese wandern in das entzündliche Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen. Darüber hinaus sind noch zahlreiche weitere Zellen an der Immunantwort beteiligt, darunter Neutrophile, Lymphozyten, aber auch Endothelzellen und Fibroblasten (156). Makrophagen sind myeloide Zellen, die nicht nur für die Phagozytose von Pathogenen und Zelldetritus verantwortlich sind, sondern als



Antigen-präsentierende Zellen entscheidend zur Produktion spezifischer Antikörper beitragen (157). Sie produzieren einerseits proinflammatorische Zytokine wie den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), andererseits aber auch verschiedene Wachstumsfaktoren, darunter den *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) und VEGF, wodurch die Zellproliferation und Gefäßneubildung gefördert wird (154, 157, 158). Der Zustand einer Gewebhypoxie nimmt Einfluss auf die Freisetzung der verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren, aber auch auf die Morphologie, Phagozytose, metabolische Aktivität und Expression von Oberflächenmarkern der Makrophagen (159, 160). Unter hypoxischen Bedingungen werden beispielsweise vermehrt proangiogenetische Zytokine freigesetzt, Oberflächenrezeptoren exprimiert, Leukozyten angelockt und vermindert Phagozytose betrieben.

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Anzahl an Makrophagen zwischen EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup> Mäusen sollte berücksichtigt werden, dass uns bei dieser Immunfluoreszenzfärbung aufgrund unzureichender Gewebequalität nur drei Mäuse pro Gruppe für die Auswertung zur Verfügung standen. Dennoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied, welcher möglicherweise auf die verminderte EPCR Expression bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen zurückzuführen ist. Das Fehlen von EPCR in Tie2-positiven Zellen reduziert die Wiederherstellung der Reperfusion nach Ischämie signifikant, was zur vermehrten Gewebe-Hypoxie im ischämischen Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse führt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung Carboanhydrase-immunpositiver Zellen konnten wir indirekt die Hypoxie als Zeichen der Gewebeschädigung darstellen (**Abbildung 11**). Die vermehrte Gewebeschädigung führt zur gesteigerten Freisetzung von DAMPs und PAMPs, wodurch es zur Akkumulation von Makrophagen kommt. Des Weiteren ist das Vorhandensein von EPCR auf Endothelzellen entscheidend, um mit aPC einen Komplex zu bilden, wodurch PAR1-abhängig zytoprotektive, antiinflammatorische und antiapoptotische Signalwege in Gang gesetzt werden können (141, 142). Im ischämischen Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse konnte als Zeichen der reduzierten zytoprotektiven Aktivität des aPC eine signifikant erhöhte Anzahl an p53-immunpositiven Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 14**). p53 ist ein Tumorsuppressorgen, welches die Reparatur von zellulärer DNA reguliert und den Prozess der Apoptose induzieren kann (161, 162). In einer Studie von *Cheng et al.* konnte gezeigt werden, dass die antiapoptotische Eigenschaft des aPC im Rahmen

einer zerebralen Ischämie in Anwesenheit von EPCR und PAR1 durch die Hemmung der p53-induzierten Apoptose vermittelt wird (163). Bei der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von p53-immunpositiven Zellen färbten wir gleichzeitig auch CD31-immunpositive Zellen an. Zur besseren Veranschaulichung des p53-Signals sind in **Abbildung 14** Confocal-Bilder dargestellt, bei denen die CD31 Expression ausgeblendet wurde. Anhand der doppelt-positiven Zellen zeigte sich, dass die vermehrte p53 Expression unter anderem auf Endothelzellen zurückzuführen ist. Nicht auszuschließen ist, dass auch Perizyten, welche sich den Endothelzellen direkt anlagern, einen Zellkontakt mit ihnen bilden und gemeinsam die Gefäßwände in Kapillaren und post-kapillären Venolen formen (164, 165), vermehrt apoptotisch wurden.

### **5.6 Die Zellproliferation wird nicht von der reduzierten EPCR Expression beeinflusst**

Mit Hilfe einer weiteren Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von PCNA-immunpositiven Zellen stellten wir die Zellproliferation als Zeichen von Zellteilung und -wachstum dar. Eine hohe Zellproliferationsrate ist ein Hinweis auf ein aktives, sich teilendes Gewebe, wie es zum Beispiel nach Verletzungen oder bei Entzündungen vorliegt. Entgegen unseren Erwartungen zeigten die Ergebnisse unserer Studie eine leichte, nicht signifikante Zunahme von PCNA-immunpositiven Zellen bei EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen in Vergleich zu den EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren, jeweils konnte mehr Zellproliferation im nicht-ischämischen Hinterlauf als im ischämischen Hinterlauf nachgewiesen werden (**Abbildung 13**). Bei Betrachtung unserer Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass uns aufgrund unzureichender Gewebequalität nur vier bzw. fünf Mäuse pro Mausgruppe für die Quantifizierung zur Verfügung standen. In Hinblick auf die Fähigkeit des aPC, die Proliferation von Endothelzellen zu stimulieren (152), wäre ein vermehrter Nachweis von PCNA-immunpositiven Zellen eher bei den EPCR<sup>fl/fl</sup> Kontrolltieren mit intaktem EPCR zu erwarten gewesen. Jedoch könnte auch die vermehrte Gewebeschädigung im Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse zur gesteigerten Zellproliferation beigetragen haben. Unsere Ergebnisse geben Auskunft über die Zellproliferation im *M. gastrocnemius* 28 Tage nach der Operation zur Induktion einer einseitigen Hinterlaufischämie. Über die Entwicklung der Zellproliferation im Zeitraum von Operation bis zur Gewebeentnahme ergeben sich

keine Informationen. Möglicherweise war die Proliferation neuer Zellen an Tag 28 bereits abgeschlossen.

Durch die histochemische Visualisierung der einzelnen Muskelfasern mittels *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) konnten wir sicherstellen, dass die bisher ermittelten Ergebnisse und Unterschiede auf zellulärer Ebene zwischen den verschiedenen Mausgruppen sowie zwischen dem jeweiligen rechten und linken Hinterlauf der Mäuse nicht auf einen Größenunterschied der einzelnen Muskelfasern zurückzuführen sind, sondern davon unabhängig sind. Misst man die Fläche pro Muskelfaser in  $\mu\text{m}^2$ , ergaben sich für EPCR<sup>fl/fl</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse sowie für 129/SvPas-C57BL/6 TM<sup>WT/WT</sup> und 129/SvPas-C57BL/6 TM<sup>Pro/Pro</sup> Mäuse keine signifikanten Größenunterschiede (**Abbildung 20**). Die einseitig induzierte Ischämie und daraus folgende Unterversorgung der Muskulatur mit Sauerstoff und Nährstoffen hatte somit keinen relevanten Einfluss auf eine Größenänderung der einzelnen Muskelfasern. Jedoch sind Variationen in der Größe der Muskelfasern möglich, abhängig von der Stelle des *M. gastrocnemius*, wo die Gewebeschnitte angefertigt wurden.

### **5.7 Postischämische Gewebehypoxie führt zu vermehrter endothelialer-zu-mesenchymaler-Transition und folglich zu mehr Fibrosebildung**

Der Prozess der endothelialen-zu-mesenchymalen-Transition (EndMT) beschreibt die Umwandlung von endothelialen in mesenchymale Zellen, wie zum Beispiel glatte Muskelzellen oder Myofibroblasten (166). Die Ergebnisse unserer Studie weisen auf das vermehrte Auftreten der EndMT im ischämischen Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse hin. Hier konnten vermehrt doppelt positive Zellen nachgewiesen werden, welche sowohl CD31 als endothelialen Marker als auch SMA bzw. PDGFR $\beta$  als mesenchymale Marker exprimierten (**Abbildungen 15-18**). Dies kann als Hinweis für den gerade ablaufenden Prozess der EndMT gesehen werden. Nicht erfasst wurden dadurch die Zellen, welche bei der Gewinnung des Gewebes entweder noch Endothelzellen waren oder die EndMT bereits abgeschlossen hatten und somit ausschließlich mesenchymale Marker exprimierten. Bei der Beurteilung unserer Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass uns pro Mausgruppe nur 5 Mäuse zur Verfügung standen.

Die EndMT spielt eine wesentliche Rolle in der embryonalen Entwicklung der Herzklappen sowie bei der Wundheilung, beeinflusst jedoch auch die Entstehung von

Malignomen und kardiovaskulären Erkrankungen wie zum Beispiel Atherosklerose, Herzklappenerkrankungen und pulmonale Hypertension (166, 167). Verschiedene Faktoren beeinflussen den Prozess der EndMT, darunter oxidativer Stress, Hypoxie und Entzündung (168). Endothelzellen exprimieren den sogenannten Hypoxie-induzierbaren-Faktor (HIF)-1 $\alpha$ , welcher als Sensor für Sauerstoff dient (169). Unter hypoxischen Bedingungen, wie es aufgrund der reduzierten Reperfusion vermehrt im ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen aufgetreten ist, kommt es zu einer Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ , wodurch unter anderem VEGF sowie das Zytokin TGF- $\beta$  vermehrt exprimiert werden (170). Dadurch werden sowohl die Angiogenese als auch die EndMT gefördert. Das Zytokin TGF- $\beta$ , welches in drei verschiedenen Isoformen existiert (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3), stellt einen wichtigen Induktor der EndMT dar, dessen Expression unter anderem auch durch eine Entzündungsreaktion hochreguliert werden kann (171). Der durch TGF- $\beta$  vermittelte Signalweg induziert die Expression der Transkriptionsfaktoren *Snail*, *Slug* und *Twist1*, wodurch es zu einer Änderung in der Expression endothelialer und mesenchymaler Gene kommt. Endothel-spezifische Gene, wie zum Beispiel der vWF, VE-Cadherin und die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) werden herab reguliert, während mesenchymale Gene wie  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ SMA) und Smooth Muscle protein 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ) vermehrt exprimiert werden (168, 171, 172).

Myofibroblasten, welche nicht nur im Rahmen der EndMT entstehen, sondern sich auch aus gewebesansässigen mesenchymalen Zellen oder aus im Blut zirkulierenden Fibrozyten entwickeln können, stellen den zellulären Mediator im Prozess der Fibrose dar (156). Fibrose ist definiert als eine Ansammlung von extrazellulärer Matrix, wie beispielsweise Kollagen und Fibronectin, welche sich vor allem in geschädigtem oder entzündlichem Gewebe bildet (173). Fibrose stellt oftmals die Folge chronisch entzündlicher Erkrankungen dar, kann fast jedes menschliche Organ betreffen und dessen Funktion deutlich einschränken. Die EndMT trägt somit neben den bisher genannten Pathologien unter anderem auch zur Entstehung fibrotischer Veränderungen des Herzens, der Niere und der Haut bei (168, 171). Auch in unserer Studie konnten wir einen gesteigerten fibrotischen Umbau des *M. gastrocnemius* infolge der EndMT feststellen. Im ischämischen Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse, in dem der Prozess der EndMT am stärksten ausgeprägt war, konnten histochemisch am meisten Kollagenfasern als Zeichen der Fibrose dargestellt werden (**Abbildung 19**). Auch die vermehrte Ansammlung von Makrophagen in diesem

## Diskussion

---

Hinterlauf könnte auf den fibrotischen Umbau Einfluss genommen haben. Aktivierte Makrophagen produzieren profibrotische Faktoren wie TGF- $\beta$ 1 und PDGF, wodurch Fibroblasten aktiviert werden, welche sich dann in Myofibroblasten umwandeln (174).

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit der zentralen Fragestellung beschäftigt, welchen Einfluss die endothelialen Rezeptoren TM und EPCR sowie die durch PAR1 vermittelte Signaltransduktion auf die Gefäßneubildung und die Wiederherstellung der Gewebepерfusion nach einer Ischämie haben. Versuche mit 129/SvPas-C57BL6  $TM^{Pro/Pro}$  Mäusen und deren  $TM^{WT/WT}$  Kontrolltieren zeigten, dass eine reduzierte Expression von TM zu einer signifikant gesteigerten Reperfusion des ischämischen Hinterlaufs sowie zu einer erhöhten Anzahl an Endothelzellen führt. Grund hierfür könnte die damit verbundene vermehrte Expression von Thrombin und dessen proangiogenetische Eigenschaften sein. Darüber hinaus zeigte sich jedoch, dass der proangiogenetische Phänotyp der  $TM^{Pro/Pro}$  Mäuse nur in Kombination mit einer gesteigerten Expression des EPCR zu beobachten ist. Das Vorhandensein von EPCR stellte sich in unserem Mausmodell entscheidend für die post-ischämische Regenerierung neuer Kapillaren dar. Bei  $EPCR^{fl/fl}Tie2.Cre^+$  Mäusen, bei denen immunhistochemisch eine stark reduzierte endotheliale EPCR Expression nachweisbar war, zeigte sich eine signifikant verminderte Reperfusion der ischämischen Hinterlauf-Muskulatur verglichen mit deren Kontrolltieren. Hingegen stellte sich bei  $EPCR^{fl/fl}LysM.Cre^+$  Mäusen, bei denen eine genetische Deletion des EPCR auf myeloischen Zellen vorlag, keine Einschränkung der Gefäßneubildung unter ischämischen Bedingungen dar. Dies deutet auf eine entscheidende Rolle der EPCR Expression auf Tie2-exprimierenden Endothelzellen im Prozess der Angiogenese hin. Zusätzliche Versuche, bei denen EPCR ausschließlich auf Endothelzellen ausgeschaltet wird, könnten an dieser Stelle sinnvoll sein, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Tie2.Cre-Rekombinase EPCR auch in myeloischen und hämatopoetischen Zellen deletiert.

Darüber hinaus konnten wir in unserer Studie beobachten, dass die globale Deletion des PAR1 mit einer stark verminderten postischämischen Wiederherstellung der Durchblutung im Hinterlauf von  $PAR1^{-/-}$  Mäusen verbunden ist. Im Detail zeigte sich, dass die Angiogenese in unserem Modell vorwiegend von der zytoprotektiven aPC-abhängigen PAR1 Aktivierung beeinflusst wird und weniger von der proteolytischen Spaltung des PAR1 durch Thrombin. Die mit Hilfe der LDPI Messung ermittelte Reperfusion des ischämischen Hinterlaufs zeigte sich bei aPC-resistenten C57BL/6N  $PAR1 R46Q$  Mäusen deutlich eingeschränkter als bei Tieren der Mauslinie C57BL/6N  $PAR1 R41Q$ , welche Thrombin-, Faktor Xa- und aPC-resistent sind.

Weitere immunhistochemische Untersuchungen von Tieren der Mauslinien EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> und EPCR<sup>fl/fl</sup> ermöglichten es uns, zelluläre Veränderungen des *M. gastrocnemius* nach einseitig induzierter Hinterlauf-Ischämie genauer zu charakterisieren. Als Folge der reduzierten, postischämischen Revaskularisation konnte im rechten Hinterlauf der EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäuse eine vermehrte Gewebehypoxie nachgewiesen werden, gleichzeitig beobachteten wir eine signifikant vermehrte Einwanderung von Makrophagen in das geschädigte Gewebe. Darüber hinaus stellte sich als Zeichen der reduzierten zytoprotektiven Aktivität des aPC eine signifikant erhöhte Anzahl p53-immunpositiver Zellen dar. Die vermehrte p53-Expression als Hinweis apoptotischer Prozesse ließ sich unter anderem auf Endothelzellen zurückführen. In Hinblick auf die Zellproliferation sowie die Größe einzelner Muskelfasern stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien dar. Stattdessen konnten wir immunhistochemisch ein vermehrtes Auftreten der EndMT im ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen nachweisen. Hypoxie und Entzündung gehören zu den Faktoren, die den Prozess der EndMT vorantreiben. Als Folge der vermehrten EndMT konnten im ischämischen Hinterlauf von EPCR<sup>fl/fl</sup>Tie2.Cre<sup>+</sup> Mäusen am meisten Kollagenfasern als Zeichen der Fibrose dargestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten auf eine entscheidende Rolle der endothelialen EPCR-vermittelten Protein C Aktivierung sowie der zytoprotektiven aPC-induzierten Signalübertragung durch PAR1 im Rahmen der postischämischen Neubildung von Gefäßen hin. Defekte in diesem Signalweg führen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Wiederherstellung der Gewebepерfusion sowie zu vermehrtem Auftreten von Apoptose, Hypoxie und Fibrose. Der genaue Mechanismus, welchem die reduzierte postischämische Revaskularisation zu Grunde liegt, kann im Rahmen dieser Dissertation nicht vollständig geklärt werden, dies ist der Fokus nachfolgender Untersuchungen zum EPCR–PAR1 Signalweg innerhalb der Arbeitsgruppe. In dieser Studie untersuchten wir die postischämische Neubildung von Gefäßen im *M. gastrocnemius*, interessant wäre auch der Einfluss auf eine Ischämie am Herzen. Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf die Frage der Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf den menschlichen Körper gelegt werden. Neue Erkenntnisse hinsichtlich der postischämischen Gefäßneubildung könnten relevant sein für eine verbesserte Therapie und damit die Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003;9(6):653-60.
2. Bochenek ML, Schafer K. Role of Endothelial Cells in Acute and Chronic Thrombosis. *Hamostaseologie*. 2019;39(2):128-39.
3. Alias S, Redwan B, Panzenboeck A, Winter MP, Schubert U, Voswinckel R, et al. Defective angiogenesis delays thrombus resolution: a potential pathogenetic mechanism underlying chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(4):810-9.
4. Evans CE, Grover SP, Humphries J, Saha P, Patel AP, Patel AS, et al. Antiangiogenic therapy inhibits venous thrombus resolution. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(3):565-70.
5. Loghmani H, Conway EM. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood*. 2018;132(2):148-58.
6. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007;109(8):3161-72.
7. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(19):10212-6.
8. Rezaie AR. Protease-activated receptor signalling by coagulation proteases in endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis*. 2014;112(5):876-82.
9. Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *The American journal of pathology*. 2001;159(3):797-802.
10. Ireland H, Kunz G, Kyriakoulis K, Stubbs PJ, Lane DA. Thrombomodulin gene mutations associated with myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96(1):15-8.
11. Radeva MY, Waschke J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2018;222(1).
12. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):620-36.
13. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(6):937-54.
14. Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E. Plaque rupture in humans and mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):705-13.
15. Kruger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
16. Colburn P, Buonassisi V. Anti-clotting activity of endothelial cell cultures and heparan sulfate proteoglycans. *Biochemical and biophysical research communications*. 1982;104(1):220-7.
17. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(6):1351-60.
18. O'Sullivan JM, Preston RJS, Robson T, O'Donnell JS. Emerging Roles for von Willebrand Factor in Cancer Cell Biology. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2018;44(2):159-66.
19. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC cardiovascular disorders*. 2015;15:130.
20. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annual review of cell biology*. 1990;6:217-46.



21. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews*. 2011;25(4):155-67.
22. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews*. 2013;93(1):327-58.
23. Behrends JC. *Physiologie*. Duale Reihe. 3., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart 2017. p. 189-95.
24. Rijken DC, Wijngaards G, Welbergen J. Immunological characterization of plasminogen activator activities in human tissues and body fluids. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1981;97(4):477-86.
25. Huber D, Cramer EM, Kaufmann JE, Meda P, Masse JM, Kruithof EK, et al. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood*. 2002;99(10):3637-45.
26. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(1):4-13.
27. Perry DJ. Antithrombin and its inherited deficiencies. *Blood reviews*. 1994;8(1):37-55.
28. Mammen EF. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1998;24(1):19-25.
29. Caplice NM, Panetta C, Peterson TE, Kleppe LS, Mueske CS, Kostner GM, et al. Lipoprotein (a) binds and inactivates tissue factor pathway inhibitor: a novel link between lipoproteins and thrombosis. *Blood*. 2001;98(10):2980-7.
30. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;86(4):959-72.
31. Dahm A, Van Hylckama Vlieg A, Bendz B, Rosendaal F, Bertina RM, Sandset PM. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood*. 2003;101(11):4387-92.
32. Javanmard SH, Shahsavarzadeh T, Saadatnia M. Low levels of tissue factor pathway inhibitor increase the risk of cerebral venous thrombosis. *Advanced biomedical research*. 2015;4:6.
33. Wuillemin WA, Minnema M, Meijers JC, Roem D, Eerenberg AJ, Nuijens JH, et al. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor. *Blood*. 1995;85(6):1517-26.
34. Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(6):1396-404.
35. Chung DW, Fujikawa K. Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13. *Biochemistry*. 2002;41(37):11065-70.
36. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001;413(6855):488-94.
37. Kaikita K, Soejima K, Matsukawa M, Nakagaki T, Ogawa H. Reduced von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in acute myocardial infarction. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(11):2490-3.
38. Bongers TN, de Maat MP, van Goor ML, Bhagwanbali V, van Vliet HH, Gomez Garcia EB, et al. High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke*. 2006;37(11):2672-7.
39. Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(8):1374-83.

40. Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *The Journal of cell biology*. 1985;101(2):363-71.
41. Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1(7):1515-24.
42. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, et al. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature*. 2000;404(6777):518-25.
43. Shi CS, Shi GY, Chang YS, Han HS, Kuo CH, Liu C, et al. Evidence of human thrombomodulin domain as a novel angiogenic factor. *Circulation*. 2005;111(13):1627-36.
44. Sadler JE, Lentz SR, Sheehan JP, Tsiang M, Wu Q. Structure-function relationships of the thrombin-thrombomodulin interaction. *Haemostasis*. 1993;23 Suppl 1:183-93.
45. Martin FA, Murphy RP, Cummins PM. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;304(12):H1585-97.
46. Tsiang M, Lentz SR, Sadler JE. Functional domains of membrane-bound human thrombomodulin. EGF-like domains four to six and the serine/threonine-rich domain are required for cofactor activity. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(9):6164-70.
47. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):26s-32s.
48. Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Annals of medicine*. 2006;38(6):378-88.
49. Adams TE, Huntington JA. Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(8):1738-45.
50. Dahlback B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(7):1311-20.
51. Nicolaes GA, Dahlback B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(4):530-8.
52. Plautz WE, Sekhar Pilli VS, Cooley BC, Chattopadhyay R, Westmark PR, Getz T, et al. Anticoagulant Protein S Targets the Factor IXa Heparin-Binding Exosite to Prevent Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(4):816-28.
53. Saito A. Diversity of human plasma protein C inhibitor. *Thrombosis research*. 2012;130(4):661-6.
54. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *The Journal of clinical investigation*. 1981;68(5):1370-3.
55. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994;369(6475):64-7.
56. Kunz G, Ireland HA, Stubbs PJ, Kahan M, Coulton GC, Lane DA. Identification and characterization of a thrombomodulin gene mutation coding for an elongated protein with reduced expression in a kindred with myocardial infarction. *Blood*. 2000;95(2):569-76.
57. Fukudome K, Esmon CT. Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural

- and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(10):5571-7.
58. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Hidari N, Esmon CT. Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(2):411-8.
59. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Jr., Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation*. 1997;96(10):3633-40.
60. Maruyama I, Majerus PW. The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A549 lung cancer cells. Endocytosis and degradation of thrombin. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(29):15432-8.
61. Gleeson EM, O'Donnell JS, Preston RJ. The endothelial cell protein C receptor: cell surface conductor of cytoprotective coagulation factor signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012;69(5):717-26.
62. Fager AM, Machlus KR, Ezban M, Hoffman M. Human platelets express endothelial protein C receptor, which can be utilized to enhance localization of factor VIIa activity. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2018;16(9):1817-29.
63. Mohan Rao LV, Esmon CT, Pendurthi UR. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood*. 2014;124(10):1553-62.
64. Gu JM, Crawley JT, Ferrell G, Zhang F, Li W, Esmon NL, et al. Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(45):43335-43.
65. Nieman MT. Protease-activated receptors in hemostasis. *Blood*. 2016;128(2):169-77.
66. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64(6):1057-68.
67. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5574):1880-2.
68. Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:67.
69. Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *British journal of pharmacology*. 2010;160(2):191-203.
70. Bae JS, Yang L, Manithody C, Rezaie AR. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood*. 2007;110(12):3909-16.
71. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-64.
72. Mosnier LO, Sinha RK, Burnier L, Bouwens EA, Griffin JH. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood*. 2012;120(26):5237-46.
73. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(8):1800-14.
74. Ludeman MJ, Kataoka H, Srinivasan Y, Esmon NL, Esmon CT, Coughlin SR. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(13):13122-8.
75. Schuepbach RA, Madon J, Ender M, Galli P, Riewald M. Protease-activated receptor-1 cleaved at R46 mediates cytoprotective effects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012;10(8):1675-84.

76. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation. *Blood*. 2015;125(19):2898-907.
77. Thiyagarajan M, Fernandez JA, Lane SM, Griffin JH, Zlokovic BV. Activated protein C promotes neovascularization and neurogenesis in postischemic brain via protease-activated receptor 1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(48):12788-97.
78. Iba T, Levy JH, Raj A, Warkentin TE. Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(5).
79. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*. 1995;11:35-71.
80. Balazs AB, Fabian AJ, Esmon CT, Mulligan RC. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood*. 2006;107(6):2317-21.
81. Gur-Cohen S, Itkin T, Chakrabarty S, Graf C, Kollet O, Ludin A, et al. PAR1 signaling regulates the retention and recruitment of EPCR-expressing bone marrow hematopoietic stem cells. *Nature medicine*. 2015;21(11):1307-17.
82. Wang D, Cai C, Dong X, Yu QC, Zhang XO, Yang L, et al. Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature*. 2015;517(7532):81-4.
83. Yu QC, Song W, Wang D, Zeng YA. Identification of blood vascular endothelial stem cells by the expression of protein C receptor. *Cell research*. 2016;26(10):1079-98.
84. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5302):964-7.
85. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307.
86. Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(1):45-55.
87. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*. 2003;9(6):685-93.
88. Caunt M, Huang YQ, Brooks PC, Karpatkin S. Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1(10):2097-102.
89. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(3):165-77.
90. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science (New York, NY)*. 1997;277(5322):55-60.
91. Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(6):1991-2005.
92. Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, Maragoudakis ME. Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *The American journal of physiology*. 1997;273(1 Pt 1):C239-45.
93. Huang YQ, Li JJ, Hu L, Lee M, Karpatkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;86(4):1094-8.

94. Huang YQ, Li JJ, Hu L, Lee M, Karpatkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood*. 2002;99(5):1646-50.
95. Kuo CH, Sung MC, Chen PK, Chang BI, Lee FT, Cho CF, et al. FGFR1 mediates recombinant thrombomodulin domain-induced angiogenesis. *Cardiovascular research*. 2015;105(1):107-17.
96. Kuo CH, Chen PK, Chang BI, Sung MC, Shi CS, Lee JS, et al. The recombinant lectin-like domain of thrombomodulin inhibits angiogenesis through interaction with Lewis Y antigen. *Blood*. 2012;119(5):1302-13.
97. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and tissue research*. 2003;314(1):107-17.
98. Mentzer SJ, Konerding MA. Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*. 2014;17(3):499-509.
99. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2018;36(2):161-71.
100. 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. *Nature protocols*. 2009;4(12):1737-46.
101. Troidl K, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2012;28 Suppl 1:27-9.
102. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*. 1995;11:73-91.
103. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of neuro-oncology*. 2000;50(1-2):1-15.
104. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research*. 1999;85(3):221-8.
105. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(3):C572-9.
106. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *The EMBO journal*. 1999;18(14):3964-72.
107. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research*. 2004;95(4):343-53.
108. Weiler-Guettler H, Christie PD, Beeler DL, Healy AM, Hancock WW, Rayburn H, et al. A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(9):1983-91.
109. Weiler H, Lindner V, Kerlin B, Isermann BH, Hendrickson SB, Cooley BC, et al. Characterization of a mouse model for thrombomodulin deficiency. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(9):1531-7.
110. Healy AM, Hancock WW, Christie PD, Rayburn HB, Rosenberg RD. Intravascular coagulation activation in a murine model of thrombomodulin deficiency: effects of lesion size, age, and hypoxia on fibrin deposition. *Blood*. 1998;92(11):4188-97.
111. Payne S, De Val S, Neal A. Endothelial-Specific Cre Mouse Models. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(11):2550-61.
112. Connolly AJ, Suh DY, Hunt TK, Coughlin SR. Mice lacking the thrombin receptor, PAR1, have normal skin wound healing. *The American journal of pathology*. 1997;151(5):1199-204.

113. Sinha RK, Wang Y, Zhao Z, Xu X, Burnier L, Gupta N, et al. PAR1 biased signaling is required for activated protein C in vivo benefits in sepsis and stroke. *Blood*. 2018;131(11):1163-71.
114. Heida NM, Leifheit-Nestler M, Schroeter MR, Muller JP, Cheng IF, Henkel S, et al. Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin (alpha)vbeta5: implications for angiogenesis in human obesity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(2):200-6.
115. Peng X, Wang J, Lassance-Soares RM, Najafi AH, Sood S, Aghili N, et al. Gender differences affect blood flow recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;300(6):H2027-34.
116. Aref Z, de Vries MR, Quax PHA. Variations in Surgical Procedures for Inducing Hind Limb Ischemia in Mice and the Impact of These Variations on Neovascularization Assessment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15).
117. Schaffner F, Yokota N, Carneiro-Lobo T, Kitano M, Schaffer M, Anderson GM, et al. Endothelial protein C receptor function in murine and human breast cancer development. *PloS one*. 2013;8(4):e61071.
118. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;99(2):305-15.
119. Li JY, Su CH, Wu YJ, Tien TY, Hsieh CL, Chen CH, et al. Therapeutic angiogenesis of human early endothelial progenitor cells is enhanced by thrombomodulin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(11):2518-25.
120. Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD, Weiler H. Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(3):850-4.
121. Rakocevic J, Orlic D, Mitrovic-Ajtic O, Tomasevic M, Dobric M, Zlatic N, et al. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Experimental and molecular pathology*. 2017;102(2):303-13.
122. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Experimental and molecular pathology*. 2002;72(3):221-9.
123. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Current opinion in hematology*. 2016;23(3):253-9.
124. Yokota N, Zarpellon A, Chakrabarty S, Bogdanov VY, Gruber A, Castellino FJ, et al. Contributions of thrombin targets to tissue factor-dependent metastasis in hyperthrombotic mice. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2014;12(1):71-81.
125. Duarte M, Kolev V, Soldi R, Kirov A, Graziani I, Oliveira SM, et al. Thrombin induces rapid PAR1-mediated non-classical FGF1 release. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;350(3):604-9.
126. Tang H, Low B, Rutherford SA, Hao Q. Thrombin induces endocytosis of endoglin and type-II TGF-beta receptor and down-regulation of TGF-beta signaling in endothelial cells. *Blood*. 2005;105(5):1977-85.
127. Blackburn JS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis. *The American journal of pathology*. 2008;173(6):1736-46.
128. Duarte M, Kolev V, Kacer D, Mouta-Bellum C, Soldi R, Graziani I, et al. Novel cross-talk between three cardiovascular regulators: thrombin cleavage fragment of

- Jagged1 induces fibroblast growth factor 1 expression and release. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(11):4863-74.
129. Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: involvement of alphavbeta3-integrin. *American journal of physiology Cell physiology*. 2002;283(5):C1501-10.
130. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (New York, NY)*. 1994;264(5158):569-71.
131. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, et al. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(3):520-6.
132. Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, et al. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(7):775-87.
133. Morales-Hernández A, Martinat A, Chabot A, Kang G, McKinney-Freeman S. Elevated Oxidative Stress Impairs Hematopoietic Progenitor Function in C57BL/6 Substrains. *Stem cell reports*. 2018;11(2):334-47.
134. Huang TT, Naeemuddin M, Elchuri S, Yamaguchi M, Kozy HM, Carlson EJ, et al. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Human molecular genetics*. 2006;15(7):1187-94.
135. Ye X, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Satoh T, Tokunaga O, Sugawara K, et al. The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;259(3):671-7.
136. Xue M, March L, Sambrook PN, Fukudome K, Jackson CJ. Endothelial protein C receptor is overexpressed in rheumatoid arthritic (RA) synovium and mediates the anti-inflammatory effects of activated protein C in RA monocytes. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(12):1574-80.
137. Li W, Zheng X, Gu J, Hunter J, Ferrell GL, Lupu F, et al. Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(7):1351-9.
138. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circulation research*. 2012;110(4):624-37.
139. Peters EB. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2018;24(1):1-24.
140. Iwasaki H, Arai F, Kubota Y, Dahl M, Suda T. Endothelial protein C receptor-expressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver. *Blood*. 2010;116(4):544-53.
141. Feistritzer C, Schuepbach RA, Mosnier LO, Bush LA, Di Cera E, Griffin JH, et al. Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(29):20077-84.
142. Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(20):19808-14.
143. Ito T, Kakahana Y, Maruyama I. Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2016;20(2):151-8.
144. Nierodzik ML, Karparkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer cell*. 2006;10(5):355-62.

145. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nature medicine*. 2004;10(5):502-9.
146. Uusitalo-Jarvinen H, Kurokawa T, Mueller BM, Andrade-Gordon P, Friedlander M, Ruf W. Role of protease activated receptor 1 and 2 signaling in hypoxia-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(6):1456-62.
147. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-33.
148. Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, et al. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation*. 2001;103(13):1799-805.
149. Wang J, Yang L, Rezaie AR, Li J. Activated protein C protects against myocardial ischemic/reperfusion injury through AMP-activated protein kinase signaling. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(7):1308-17.
150. Dong W, Wang H, Shahzad K, Bock F, Al-Dabet MM, Ranjan S, et al. Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(11):2789-99.
151. Suzuki K, Hayashi T. Protein C and its inhibitor in malignancy. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2007;33(7):667-72.
152. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H, et al. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circulation research*. 2004;95(1):34-41.
153. Roy RV, Ardeshirylajimi A, Dinarvand P, Yang L, Rezaie AR. Occupancy of human EPCR by protein C induces  $\beta$ -arrestin-2 biased PAR1 signaling by both APC and thrombin. *Blood*. 2016;128(14):1884-93.
154. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450-62.
155. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*. 2011;12(11):1035-44.
156. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):199-210.
157. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):6425-40.
158. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *The Journal of pathology*. 2000;192(2):150-8.
159. Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(6):889-900.
160. Egners A, Erdem M, Cramer T. The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:2053646.
161. Wawryk-Gawda E, Chylińska-Wrzos P, Lis-Sochocka M, Chłapek K, Bulak K, Jędrych M, et al. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*. 2014;251(3):525-33.



162. Sabapathy K, Lane DP. Understanding p53 functions through p53 antibodies. *Journal of molecular cell biology*. 2019;11(4):317-29.
163. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nature medicine*. 2003;9(3):338-42.
164. Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2016;36(2):451-5.
165. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research*. 2005;97(6):512-23.
166. Kovacic JC, Dimmeler S, Harvey RP, Finkel T, Aikawa E, Krenning G, et al. Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73(2):190-209.
167. Bischoff J. Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Circulation research*. 2019;124(8):1163-5.
168. Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovascular research*. 2018;114(4):565-77.
169. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed research international*. 2015;2015:549412.
170. Doerr M, Morrison J, Bergeron L, Coomber BL, Vilorio-Petit A. Differential effect of hypoxia on early endothelial-mesenchymal transition response to transforming growth beta isoforms 1 and 2. *Microvascular research*. 2016;108:48-63.
171. Maleszewska M, Moonen JR, Huijkman N, van de Sluis B, Krenning G, Harmsen MC. IL-1 $\beta$  and TGF $\beta$ 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF $\kappa$ B-dependent manner. *Immunobiology*. 2013;218(4):443-54.
172. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circulation research*. 2002;90(11):1189-96.
173. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine*. 2012;18(7):1028-40.
174. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in liver disease*. 2010;30(3):245-57.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich ... für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen, für die ausgezeichnete Betreuung und die unermüdliche Unterstützung bei der Umsetzung meiner gesamten Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei ... für die hervorragende Betreuung, die ausführliche Anleitung im Labor sowie die zahlreichen produktiven Gespräche und Anregungen.

Meinen Dank möchte ich außerdem ... für seine Bereitschaft als Zweitgutachter meiner Dissertation aussprechen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die allzeit angenehme und hilfsbereite Zusammenarbeit. Mein großer Dank gilt hierbei ... und ... für die sorgfältige Einweisung in die Laborarbeit sowie die stetige Unterstützung und Beratung. ... danke ich für die freundliche Überlassung seiner Western Blot Ergebnisse.

..., ... sowie ... danke ich für die Bereitstellung der Versuchsmäuse.

Nicht zuletzt gilt mein Dank ... für die Durchsicht meiner Doktorarbeit. ... danke ich für die Geduld und die stetige Ermutigung während der Arbeit an dieser Dissertation.