

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislauferkrankungen

Rolle des auf Thrombozyten exprimierten
Komplementrezeptors C5aR für die Modulation der
Angiogenese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Nording, Henry Morten

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-F. Langer
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Mahrholdt
3. Berichterstatter: Professor Dr. C. A. Gleißner
Tag der Disputation: 13.12.2017

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	I
1 EINLEITUNG	4
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	6
1.2 Angiogenese	8
1.2.1 Regulation der Angiogenese	10
1.3 Das Komplementsystem	12
1.3.1 Funktion des Komplementsystems.....	13
1.3.2 Die Anaphylatoxine	15
1.4 Thrombozyten	16
1.4.1 Thrombozyten in der primären Hämostase.....	16
1.4.2 Thrombozyten als Immunzellen.....	18
1.4.3 Thrombozyten in der Angiogenese.....	19
1.4.4 Thrombozyten und das Komplementsystem.....	20
1.5 Fragestellung	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Versuchstiere.....	22
2.2 Isolierung von Thrombozyten.....	23
2.2.1 Thrombozytenisolierung aus humanem Blut.....	23
2.2.2 Thrombozytenisolierung aus murinem Blut.....	24
2.2.3 Stimulation humaner Thrombozyten	25
2.2.4 Gewinnung von Thrombozytenüberstand.....	25
2.3 In vivo Matrigelplug-Assay	26
2.3.1 Systemische Thrombozytendepletion in vivo	27
2.3.2 Systemische PF4-Inhibition in vivo	27
2.3.3 Auswertung und Quantifizierung.....	28

2.4 Hindlimb-ischemia-Assay	28
2.4.1 Operatives Vorgehen	29
2.4.2 Laserdoppler-Fluximetrie.....	29
2.4.3 Postoperative Versorgung und Probenaufbereitung	30
2.5 Histologie	33
2.5.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung	33
2.5.2 Immunfluoreszenz-Färbungen.....	34
2.5.3 Mikroskopie	35
2.6 Durchflusszytometrie	36
2.6.1 Durchflusszytometrische Analyse der C5aR-Expression auf Thrombozyten	37
2.6.2 Durchflusszytometrische Analyse der Modulation der C5aR-Expression von Thrombozyten nach Stimulation	37
2.7 Isolation von primären Endothelzellen (MLECs).....	38
2.8 In vitro Endothelzell-Assays	40
2.8.1 Kultur von Endothelzellen in vitro	41
2.8.2 Proliferation-Assay in vitro.....	41
2.8.3 Migration-Assay in vitro	42
2.8.4 Tube formation-Assay in vitro	42
2.9 ELISA-Analyse vom Thrombozytenüberstand.....	43
2.10 Statistische Analyse.....	44
3 ERGEBNISSE.....	45
3.1 Thrombozyten inhibieren wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese in vivo	45
3.2 Thrombozyten exprimieren den C5a-Rezeptor im angiogen aktiven Gewebe in vivo	47
3.3 Thrombozyten modulieren die Expression des C5a-Rezeptors in vitro	49

3.4 Einfluss des thrombozytären C5a-Rezeptors auf die Proliferation von Endothelzellen in vitro.....	52
3.5 Einfluss des thrombozytären C5a-Rezeptors auf die Migration von Endothelzellen in vitro	53
3.6 Einfluss des thrombozytären C5a-Rezeptors auf die Tube formation von Endothelzellen in vitro	56
3.7 C5a-Rezeptor-Knockout-Mäuse zeigen ein erhöhtes Niveau an wachstumsfaktorinduzierter Angiogenese in vivo	59
3.8 C5a-Rezeptor-Knockout-Mäuse zeigen ein erhöhtes Niveau an hypoxiegetriggelter Angiogenese in vivo	60
3.9 Unter systemischer Thrombozytendepletion besteht kein Unterschied im Angiogeneseniveau zwischen WT- oder C5aR-Knockout-Tieren in vivo	63
3.10 Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout Mäuse senkt deren erhöhtes Angiogeneseniveau in vivo	66
3.11 Einfluss von C5a-stimuliertem Thrombozytenüberstand auf die Migration von Endothelzellen in vitro.....	69
3.12 Einfluss von C5a-stimuliertem Thrombozytenüberstand auf die Tube formation von Endothelzellen in vitro.....	70
3.13 Thrombozyten sekretieren PF4 nach Stimulation mit C5a in vitro	71
3.14 Unter systemischer PF4-Inhibition hat Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout-Mäuse keinen Einfluss auf das Angiogeneseniveau im Matrigelplug-Assay in vivo	76
4 DISKUSSION.....	79

5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATUR	89
7	ABBILDUNGEN	103
8	TABELLEN	105
9	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	106
10	VERÖFFENTLICHUNGEN	107
11	DANKSAGUNG	108
12	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
ACD	acid-citrate-dextrose
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMD	age-related macular degeneration, altersbedingte Makuladegeneration
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	bovine serum albumin, bovines Serumalbumin
d	Tag
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ECGS	endothelial cell growth supplement
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
et al.	Et altera, und Kollegen
FACS	Fluorescence-activated cell sorter, Durchflusszytometrie
FBS	fetal bovine serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter
g	gravitation force, Gravitationskraft oder Gramm
GP	Glykoprotein

H&E	Hämatoxylin und Eosin
Hb	Haemoglobin
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
KHK	koronaren Herzkrankheit
LDI	Laserdoppler-Imager
MAC	membrane attack complex, membranangreifender Komplex
MFI	mean fluorescence intensity, mittlere Fluoreszenzaktivität
MHEC-5T	mouse heart endothelial cell clone 5-transformed, murine 5-T-Herz-endothelzellen
min	Minute
MLEC	primary mouse lung endothelial cells, primäre murine Lungenendothelzelle
n.s.	nicht signifikant
OCT	optimum cutting temperature compound
oxLDL	oxidiertes low-density Lipoprotein
P/S	Penicillin-Streptomycin Lösung
PAR	Proteinase-aktivierte Rezeptoren 1 und 4 (PAR1 und PAR4)
PBS	phosphate-buffered saline solution, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	Tween-PBS
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PF4	platelet factor 4, Plättchenfaktor 4
postOP	postoperativ

PPP	platelet poor plasma, thrombozytenarmes Plasma
preOP	präoperativ
PRP	platelet rich plasma, thrombozytenreiches Plasma
s.	siehe
SF	Standardfehler
SMC	smooth muscle cell, glatte Muskelzelle
SSC	side scatter
Treg	regulatory T-cell, regulatorische T-Zelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Gewebehomöostase und Heilungsmechanismen sind für jedes Lebewesen von fundamentaler Bedeutung. Selbst einfachste Bakterien sind auf diese Mechanismen für das eigene Überleben angewiesen. Im Jahr 2015 erhielt Tomas Lindahl zusammen mit zwei anderen Wissenschaftlern den Nobelpreis für Chemie für seine Arbeit über DNA-Reparaturmechanismen von Bakterien (Lindahl, 1974). In einem so viel komplexeren Organismus wie dem von Säugetieren, gibt es zahllose Systeme, welche zusammen die Gewebehomöostase gewährleisten. Ein gut bekanntes Beispiel für solch ein System stellt das Immunsystem dar, welches für die Verteidigung des Organismus gegen äußere Störeinflüsse in der Form von Krankheitserregern zuständig ist (Ricklin et al., 2010). Doch auch nach innen kann das Immunsystem den Organismus verteidigen und so beispielsweise in einigen Fällen vor der Bildung von Neoplasien schützen (Corthay, 2014). Darüber hinaus hat das Immunsystem viele weitere Funktionen. Von Bedeutung für diese Arbeit ist, dass es auch bei kardiovaskulären Erkrankungen, denen meist atherosklerotische Gefäßveränderungen zugrunde liegen, eine wichtige Rolle spielt (Libby et al., 2009).

Auch Traumata gehen mit einer massiven Störung der Gewebehomöostase einher. Nach Entstehung einer Wunde öffnet dies ubiquitär vorkommenden Bakterien eine Eintrittspforte. Das Immunsystem spielt hier also eine bedeutende Abwehrrolle. Ebenso wichtig ist in einer solche Situation aber, dass der entstandene Defekt so schnell wie möglich verschlossen wird. Von besonderer Bedeutung ist der Verschluss von Gefäßen, da sonst unkontrolliert Volumen als Blut verloren geht (Nording et al., 2015). Die Schädigung eines Gefäßes geht mit der Schädigung der innersten Schicht der Gefäßwand einher, welche als Endothel bezeichnet wird. Blutplättchen sind spezialisiert darauf, auf Endothelschäden schnell und effektiv zu reagieren. Sie sind die Schlüsselzellen der primären Hämostase. Das plasmatische Gerinnungssystem stabilisiert den so entstandenen Thrombus mittels Thrombinbildung (Nording et al., 2015; Gawaz et al., 2005; Hagedorn et al., 2010; Jackson, 2011; Nieswandt et al., 2011; Berndt et al., 2014; Etulain and Schattner, 2014).

1. Einleitung

Gewebeschädigung kann allerdings nicht nur in Folge eines externen Traumas entstehen. Bei einem Myokardinfarkt wird Herzmuskelgewebe durch den Verschluss des versorgenden Gefäßes und daraus resultierender Ischämie geschädigt. Die Genese eines Myokardinfarktes ist meist die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques (Thygesen et al., 2012), welcher sich über einen langen Zeitraum in der Gefäßwand gebildet hat (Galkina and Ley, 2009). Blutplättchen tragen sowohl zur Bildung dieses Plaques in der Gefäßwand bei, als auch zu dessen Ruptur und insbesondere dem darauf folgenden thrombotischen Gefäßverschluss (Nording et al., 2015). Die Hemmung der Funktion von Blutplättchen ist als Therapiestrategie in der Akutsituation beim Myokardinfarkt wie auch bei der Prävention der Atherosklerose weithin akzeptiert (Ruggeri et al., 2010; Dütting et al., 2012).

Die Rolle des Immunsystems oder von Blutplättchen ist also je nach Kontext sehr unterschiedlich. Bei einer Verletzung sind Blutplättchen unverzichtbar als Mediatoren der primären Hämostase, bei einem Infarkt tragen sie maßgeblich zum Krankheitsgeschehen bei. Trotz der apparenten Unterschiede dieser Situationen, haben beide gemein, dass Gewebe durch Ischämie bedroht ist. Ischämie ist definiert als insuffiziente Versorgung mit oxygeniertem Blut (Semenza, 2001). Resultiert die Ischämie aus einem Gefäßverschluss oder der traumatischen Durchtrennung eines Gefäßes, hängt der Grad der Gewebeschädigung in beiden Fällen davon ab, wie schnell die Gewebeischämie beendet wird, wie schnell also das Gewebe wieder mit oxygeniertem Blut versorgt wird (Hearse and Bolli, 1992). In der modernen Medizin wird dieses Wissen alltäglich angewandt. Im akuten Herzinfarkt wird das Myokardgewebe schnellstmöglich revaskularisiert (Hochman et al., 2006; Amsterdam et al., 2014). Auch bei Wunden und insbesondere deren Maximalform, wenn eine Gliedmaße vollständig abgetrennt ist, kommt es darauf an, die Versorgung des ischämischen Gewebes zügig wiederherzustellen (Leclère et al., 2012).

Es gibt ein körpereigenes Homöostasesystem, welches zum Ziel hat, die Durchblutung minderversorgten Gewebes wieder zu ermöglichen. Gewebeischämie ist einer der wichtigsten Stimulatoren der Angiogenese, das heißt der Blutgefäßneubildung (Hirota and Semenza, 2006). Gewebeischämie führt unter

1. Einleitung

anderem zur Freisetzung von vascular endothelial growth factor (VEGF). Hierdurch wird die rasche Proliferation von Endothelzellen und das Wachstum von neuen Gefäßröhren aus bestehenden Gefäßen induziert (Carmeliet, 2005).

Angiogenese, Blutplättchen und das Immunsystem stehen also funktionell als Homöostasemechanismen aber auch zeitlich und örtlich in engem Zusammenhang. Diese Arbeit befasst sich mit den Überschneidungspunkten zwischen diesen Systemen.

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen spielen in der modernen Medizin eine zentrale Rolle. Zum Einen stellen kardiovaskuläre Krankheiten wie die koronare Herzerkrankung oder der akute Myokardinfarkt die Haupttodesursache in Europa dar (Stand 2012, Europäische Gesundheitsbericht 2012, 2015). Des Weiteren weisen diese Erkrankungen eine hohe Morbidität auf und sind auch global aus gesundheitsökonomischer Sicht von größter Bedeutung (Smith et al., 2013). Einer Herz- und Gefäßerkrankung zugrunde liegt in den meisten Fällen die atherosklerotische Veränderung von Arterien. Atherosklerose ist ein chronisch-entzündlicher Umbau der Blutgefäße, wobei das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt (Galkina and Ley, 2009). Bei der Entstehung der Atherosklerose spielen insbesondere immunologisch prozessierte Lipide eine zentrale Rolle (Zeibig et al., 2011), welche zur Anlockung weiterer Immunzellen beitragen und die Bildung sogenannter Schaumzellen insbesondere aus Monozyten vorantreiben (Galkina and Ley, 2009). Die Atherosklerose lässt sich einteilen in ein Initiationsstadium, bei der die Entzündung der Gefäßwand beginnt, in ein Progressionsstadium, bei dem der atherosklerotische Plaque größer wird und das Gefäß langsam obstruiert, und in ein Spätstadium, bei der der Gefäßwandplaque instabil wird und schließlich aufreißt (Galkina and Ley, 2009; Nording et al., 2015). Thrombozyten sind an jedem dieser Stadien beteiligt (Nording et al., 2015), wie später noch ausgeführt wird.

1. Einleitung

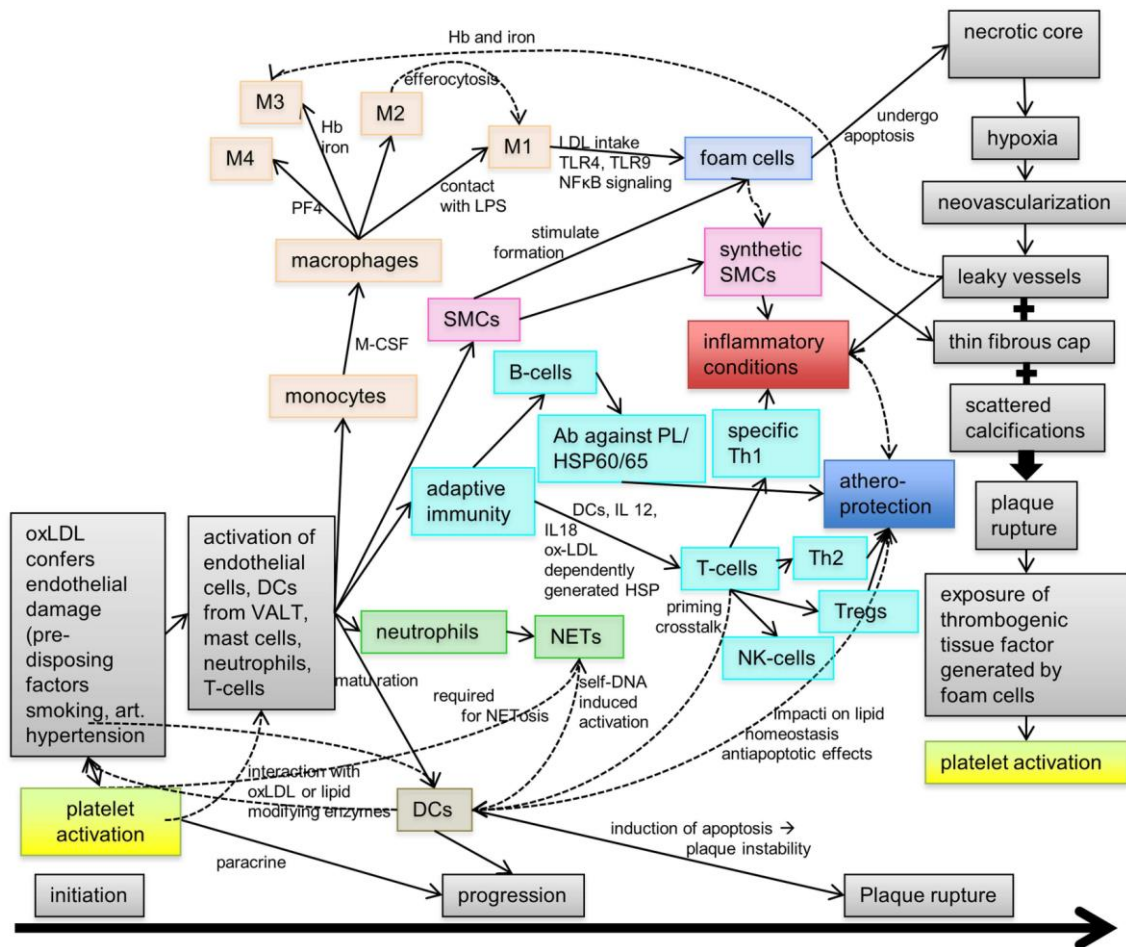


Abb. 1: Pathophysiologie der Atherosklerose

Schematische Darstellung der Einflüsse verschiedener Komponenten des Immunsystems auf die verschiedenen Stadien der Atherosklerose. Abkürzungen: Ab, Antikörper; Hb, Hämoglobin; HSP, heat shock protein; NET, neutrophil extracellular trap; PF4, platelet factor 4; SMC, glatte Muskelzelle; Treg, regulatorische T-Zelle; VALT, vascular-associated lymphatic tissue. Abbildung modifiziert nach (Nording et al., 2015).

Letztlich führen atherosklerotische Erkrankungen also zu einem Verschluss arterieller Gefäße. Dieser Verschluss kann schleichend vonstattengehen. Tritt eine solche langsam progrediente Verengung der Herzkranzarterien auf, so kann sich dies als stabile Angina pectoris klinisch manifestieren (Thygesen et al., 2012). Unter Belastung ist das Lumen des Gefäßes dann zu klein, um den Herzmuskel noch adäquat zu versorgen. Daher treten durch Myokardischämie verursachte Schmerzen auf. Beim akuten Herzinfarkt hingegen rupturiert ein instabil

1. Einleitung

gewordener atherosklerotischer Plaque, was die Freilegung des thrombogenen Kerns zu Folge hat, was Thrombozyten aktiviert und letztlich zu Aktivierung der Gerinnungskaskade führt. Durch den sich so bildenden Thrombus wird das Gefäß ganz oder zum großen Teil verschlossen (Thygesen et al., 2012; Libby and Theroux, 2005). In beiden Fällen führt dies dazu, dass das Herzmuskelgewebe unzureichend mit oxygeniertem Blut versorgt wird. Das aktuelle Therapiekonzept hierfür ist die Wiedereröffnung verschlossener oder kritisch verengter Gefäße mittels sogenannter Angioplastie (Hochman et al., 2006). Statt das erkrankte Gefäß wieder durchgängig zu machen, kann aber auch die Bildung neuer Umgehungsgefäße die Gewebeischämie abwenden, insbesondere bei der langsam progredienten KHK. Die Stimulation der Neubildung von Blutgefäßen, der Angiogenese, stellt also einen potentiellen therapeutischen Ansatz atherosklerotischer Erkrankungen dar (Mitsos et al., 2012).

Wie bereits initial dargestellt, sind das Immunsystem, Thrombozyten und Angiogenese eng zusammenhängende Regulationssysteme. Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen stehen diese Systeme miteinander in Verbindung. Durch die weitere Erforschung ihres Zusammenspiels, könnten sich in Zukunft neue therapeutische Ansätze bei kardiovaskulären Erkrankungen ergeben.

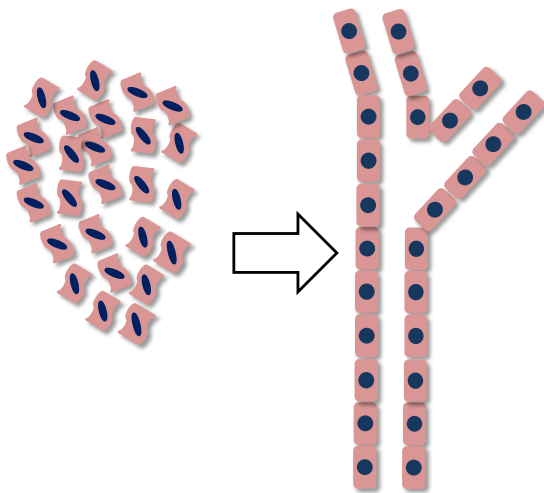
1.2 Angiogenese

Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Blutgefäße ausgehend von bereits bestehenden vaskulären Netzwerken. Vor etwa 40 Jahren begründete Judah Folkman die Angiogeneseforschung (Folkman, 1971; Mitsos et al., 2012). Seitdem ist klar, dass Endothelzellen die Schlüsselrolle bei der Angiogenese spielen. Dies sind Zellen, die das Innere jedes Gefäßes auskleiden und somit den Kontakt mit den Blutbestandteilen vermitteln (Carmeliet, 2005). Angiogenese muss vom Begriff der Vaskulogenese und der Arteriogenese abgegrenzt werden. Vaskulogenese bezeichnet die Bildung neuer Gefäße aus endothelialen Progenitorzellen. Dieser Zelltyp entsteht aus den gleichen Vorläufern wie hämatopoetische Progenitorzellen. Die Blut- und Immunzellen wie auch die Endothelzellen stammen also von den gleichen Vorgängerzellen ab. Bei der Vaskulogenese la-

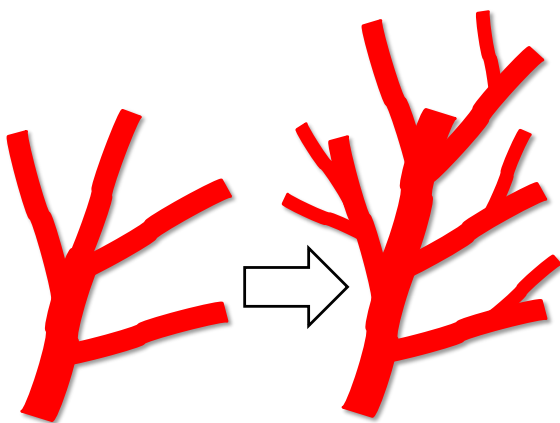
1. Einleitung

gern sich endotheliale Progenitorzellen zusammen, formen sogenannte Hämangioblasteninseln und differenzieren zu Endothelzellen (Risau and Flamme, 1995), wobei ihre Differenzierung als venöse oder arterielle Endothelzellen schon in diesem Stadium festgelegt wird (Coultas et al., 2005; Carmeliet, 2005). Das weitere Wachstum des so entstandenen primitiven Gefäßnetzwerkes wird als Angiogenese bezeichnet. Dieser Begriff bezieht sich dabei nicht nur auf die Prozesse im sich entwickelnden Organismus, der Embryogenese, sondern auch auf das Aussprossen eines bereits existierenden Gefäßnetzwerkes, sollte dies zur Erhaltung der Gewebemöostase erforderlich werden. Migration und Proliferation der Endothelzellen spielen hierbei die Hauptrolle und resultieren in der Bildung neuer Endothelröhren, welche auch als „tubes“ bezeichnet werden (Risau, 1997).

A



B



1. Einleitung

Abb. 2: Unterscheidung von Vaskulogenese und Angiogenese

Schematische Darstellung der de novo Neubildung neuer Blutgefäße durch den Zusammenschluss von endothelialen Vorläuferzellen, der Vaskulogenese (A). Die Bildung neuer Kapillargefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen mit Aussprossung und Proliferation von Endothelzellkanälen wird als Angiogenese bezeichnet (B).

Im Verlauf der Angiogenese werden primitive endotheliale "tubes" von Perizyten und glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) ummantelt. Perizyten haben nicht nur die Funktion, das Endothel physikalisch zu stabilisieren und zu schützen, sondern haben auch eine wichtige Rolle bei der immunologischen „Abschirmung“ des Endothels. Darüber hinaus sekretieren Perizyten verschiedene parakrine Faktoren wie VEGF und angiopoietin-1 zur Konsolidierung des Gefäßes (Song et al., 2005). SMCs machen es einem Gefäß möglich, den Durchmesser zu variieren und damit den Durchfluss und den dadurch entstehenden Druck zu regulieren. Dies spielt insbesondere bei der Bildung von Arterien und Arteriolen eine Rolle. Die Bildung dieser Art von Blutgefäßen wird als Arteriogenese bezeichnet (Bergmann et al., 2006).

Arteriogenese unterscheidet sich von Angiogenese in einer Reihe von Aspekten. Auch Arteriogenese bezeichnet das Aussprossen bestehender Blutgefäße. Dies geschieht hierbei allerdings nicht, indem primitive Endothelzellkanäle entstehen, sondern Arteriolen, welche aus Endothelzellen, Perizyten und SMCs aufgebaut sind. Es gibt eine Reihe genetischer „Schalter“, welche diesen Prozess kontrollieren. Anders als bei der Angiogenese ist der Hauptmotor der Arteriogenese der Druck, welchen das fließende Blut auf die Arterienwand ausübt. Dies wird als Scherdruck (shear pressure) bezeichnet (Schirmer et al., 2008). Die Signaltransduktion über den Notch-Signalweg ist hierbei von großer Bedeutung (Limbourg et al., 2007).

1.2.1 Regulation der Angiogenese

Angiogenese bezieht sich also auf das Aussprossen von Endothelzellkanälen ausgehend von bereits bestehenden Gefäßen. Im adulten Organismus befinden sich Endothelzellen meist im Ruhezustand. Sie behalten allerdings die

1. Einleitung

Fähigkeit bei, sich - wenn nötig - schnell zu teilen. Die hauptsächlichen Induktoren dieses Prozesses stellen Hypoxie und Gewebeinflammation dar (Semenza, 2001; Carmeliet, 2005).

Hypoxie induziert Angiogenese mittels Hochregulation proangiogener Faktoren (Levy et al., 1995). Dies wird hauptsächlich über den sogenannten hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) vermittelt. Die HIF-1-Gruppe von Proteinen sind im Wesentlichen Transkriptionsfaktoren, welche eine ganze Reihe von Genen in ihrer Expression mittels eines hypoxia responsive elements hochregulieren können (Hirota and Semenza, 2006). Von größter Bedeutung ist hierbei die Hochregulation des vascular endothelial growth factor (VEGF).

Angiogene Faktoren sind für die Steuerung der Angiogenese fundamental. VEGF stellt den bedeutendsten angiogenen Faktor dar. Der Effekt von VEGF, welches letztlich eine Gruppe von sechs verwandten Proteinen bezeichnet, wird vor allem über VEGF-Rezeptoren (VEGFR) vermittelt (Stimpfl et al., 2002; Hicklin and Ellis, 2005). VEGF fördert Angiogenese auf vielfältige Weise. Es induziert eine Zunahme der Gefäßpermeabilität, sodass beispielsweise Proteasen außerhalb des Gefäßes extrazelluläre Matrix abbauen und Platz für neue Gefäße schaffen können (Unemori et al., 1992). VEGF stimuliert außerdem die Proliferation von Endothelzellen (Guo et al., 1995) und deren Migration in die geschaffenen Räume, wo diese Tubuli bilden, welche sich zu Gefäßen weiterentwickeln. Neben VEGF spielen vor allem Faktoren der fibroblast growth factor (FGF) Familie eine wichtige proangiogene Rolle. Basic FGF oder bFGF ist hierbei von besonderer Bedeutung für das Endothelzellwachstum und die Differenzierung von Gefäßzellen insbesondere auch bei der Wundheilung (Itoh and Ornitz, 2011).

Neben proangiogenen Faktoren gibt es auch Faktoren, welche die Angiogenese inhibieren. Ein Beispiel hierfür ist platelet factor 4 (PF4) (Aidoudi-Ahmed and Bikfalvi, 2010). Die Bedeutung parakriner Faktoren für die Modulation der Angiogenese wird durch eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit gestützt, welche gezeigt hat, dass die Modulation der Endozytose auch Angiogenese reguliert (Gaengel and Betsholtz, 2013). Neben anderen Immunzellen enthalten auch

1. Einleitung

Blutplättchen eine Reihe von pro- und antiangiogenen Faktoren, wie noch ausgeführt wird (Patzelt and Langer, 2012; Stellos et al., 2010)

1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem stellt einen der phylogenetisch ältesten Teile des Immunsystems dar. Es besteht aus einer Gruppe von Plasmaproteinen. Neun dieser Proteine C1-C9 werden als Hauptfaktoren angesehen (Ricklin et al., 2010). Diese Faktoren werden nacheinander mittels einer enzymatischen Kaskade aktiviert. Vorstufen der Komplementfaktoren kommen ubiquitär im Organismus vor und können durch Entzündungsprozesse bei Bedarf lokal aktiviert werden. Das Komplementsystem spielt dadurch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Es zählt zur angeborenen Immunität und ist in der Lage, die Reaktion anderer Komponenten des angeborenen Immunsystems zu amplifizieren (Leslie, 2012).

Wird die Kaskade der proteolytischen Aktivierung gestartet, so spricht man von Aktivierung. Es existieren drei verschiedene Wege, wie das Komplementsystem aktiviert werden kann. Alle drei münden in der proteolytischen Spaltung von C3 in C3a und C3b. Generell aktivieren Oberflächenstrukturen von Krankheitserregern oder nekrotischen oder apoptotischen Zellen das Komplementsystem. Solche Strukturen kommen auch insbesondere in ischämischen Arealen vor (Alawieh et al., 2015).

Beim klassischen Weg bindet der Komplementfaktor C1q an Antigen-Antikörper-Komplexe, also Pathogenstrukturen, welche bereits vom adaptiven Immunsystem identifiziert wurden. Über C4 und C2 kommt es zur Aktivierung von C3 durch die C3-Konvertase. Dieser Aktivierungsweg verbindet also angeborene mit erworbener Immunität. Mannose-haltige Proteine auf der Oberfläche von Bakterien und Viren aktivieren durch Bindung des Mannose-bindenden Lektins an diese Proteine den Lektinweg der Komplementaktivierung. Dies führt zur enzymatischen Spaltung von C4 und in der Folge zur Bildung der C3-Konvertase. Beim alternativen Weg ist die Voraussetzung, dass eine Spaltung von C3 im Plasma in C3a und C3b in niedrigem Maß konstant spontan abläuft. C3b kann

1. Einleitung

sich daraufhin an Oberflächenstrukturen von Erregern anlagern. Dies führt zur Anlagerung weiterer Faktoren und zur Bildung des C3-Konvertase-Komplexes (Lambris et al., 2008).

Als Ergebnis der Komplementaktivierung entsteht C3a und C3b. C3b fügt sich nun in einen Komplex ein. Dadurch entsteht die C5-Konvertase, die C5 zu C5a und C5b spaltet (Ricklin et al., 2010). Während das Anaphylatoxin C5a direkt eine proentzündliche Wirkung entfaltet, bildet C5b mit weiteren Komponenten einen membranangreifenden Komplex (MAC), der die Lyse von Mikroorganismen bewirkt (Martel et al., 2011).

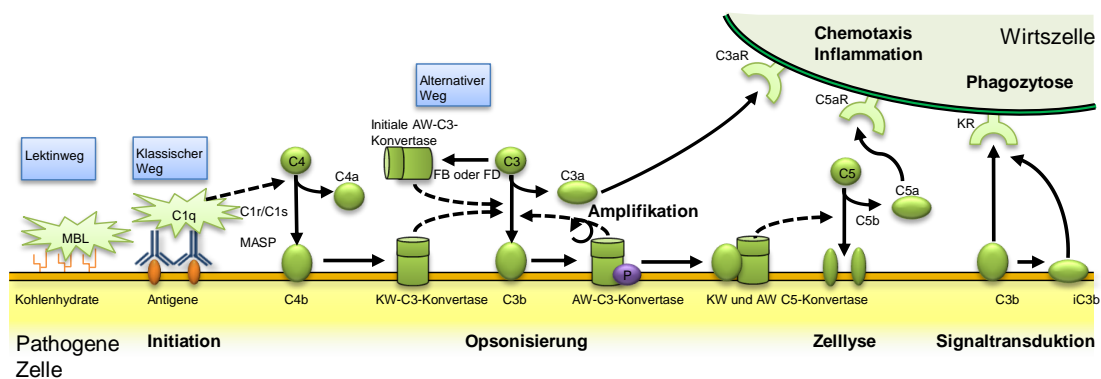


Abb. 3: **Die Komplementaktivierung**

Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt durch Antikörperkomplexe (klassischer Weg), Mannose-vermittelt (Lektinweg) oder durch spontane oder induzierte Spaltung von C3 (Alternativer Weg), sodass die C3-Konvertase gebildet und aktiviert wird. C3b führt zur Aktivierung der C5-Konvertase. C5b führt zur Bildung des MAC. Die Anaphylatoxine C3a und C5a induzieren durch Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor proinflammatorische, chemotaktische und weitere Reize (Lambris et al., 2008). Abkürzungen: KW = klassischer Weg; AW = Alternativer Weg; KR = Komplementrezeptoren; MAC = membrane attack complex, membranangreifender Komplex; MBL = Mannose-bindendes Lektin; FB = Faktor B; FD = Faktor D; MASP = MBL-assoziierte Serinprotease.

1.3.1 Funktion des Komplementsystems

Die Funktion des Komplementsystems ist die Unterstützung und Verkettung der angeborenen und erworbenen Immunität (Ricklin and Lambris, 2013). C3b, C4b und C5b setzen sich auf der Oberfläche von infektiösen Keimen fest und

1. Einleitung

markieren diese hierdurch. Man spricht dabei von Opsonisierung. Die markierten Erreger können durch das Immunsystem nun leicht erkannt und phagozytiert werden (Ricklin et al., 2010). Außerdem stimuliert das Komplementsystem die Entzündungsreaktion durch Triggerung der Freisetzung von Faktoren, die in Mastzellen gespeichert sind. Die Faktoren C5b bis C9 bilden den Membranangriffskomplex (MAC), welcher die osmotische Lyse von als fremd erkannten Zellen mittels Elektrolyteinstrom bewirkt (Ricklin and Lambris, 2013).

Über diese klassischen immunologischen Funktionen hinaus spielt das Komplementsystem in einer Reihe von weiteren Kontexten eine wichtige Rolle. So bestehen verschiedene Verbindungen zwischen dem Komplementsystem und der Gerinnungskaskade (Amara et al., 2008). Dies zeigt sich an der Bedeutung des Komplementsystems bei Erkrankungen wie paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie, hämolytisch urämischem Syndrom und Immunkomplex-Glomerulonephritis (Röth et al., 2011; Verschoor and Langer, 2013).

Eine Reihe von Komponenten des Komplementsystems sind ebenfalls an der Regulation der Angiogenese in verschiedenen pathophysiologischen Kontexten beteiligt (Rutkowski et al., 2010; Nozaki et al., 2006; Girardi et al., 2006; Rafail et al., 2015; Langer et al., 2010). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte bereits beschrieben werden, wie Komplementfaktoren die Angiogenese regulieren. So konnte gezeigt werden, dass C5a über den C5a-Komplementrezeptor auf Makrophagen die Angiogenese inhibiert und dass die Inhibierung der Anaphylatoxinrezeptoren die Bildung neuer Blutgefäße verstärkt (Langer et al., 2010). Der therapeutische Nutzen der Komplementmodulation wird zurzeit in einer Reihe klinischer Studien evaluiert (Do et al., 2014; Yehoshua et al., 2014; van Lookeren Campagne et al., 2015; Csaky et al., 2015). Trotzdem ist bisher zum größten Teil unerforscht, auf welche Art und Weise die Komplementproteine mit pro- oder antiangiogenen Zellen oder Faktoren interagieren.

1. Einleitung

1.3.2 Die Anaphylatoxine

C3a und C5a nehmen eine Sonderstellung unter den Komplementfaktoren ein. Sie sind nicht an der Fortsetzung der proteolytischen Kaskade beteiligt, sondern wirken selbst proinflammatorisch. Sie haben eine chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen und führen zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität (Markiewski and Lambris, 2007). Anaphylatoxine verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie im Tierversuch in hoher Konzentration ähnliche Symptome wie bei einem anaphylaktischen Schock hervorrufen (Markiewski and Lambris, 2007). In der Tat führen Anaphylatoxine auch zur Degranulation von Mastzellen wie bei einem allergischen Schock.

Beide Anaphylatoxine wirken proinflammatorisch, unterscheiden sich jedoch in Ihrer Potenz, wobei C5a eine etwa 100-fach höhere Potenz im Vergleich zu C3a hat. Beide haben jedoch die Funktion, lokale Entzündungsprozesse zu unterstützen und mittels ihrer chemotaktischen Wirkung weitere inflammatorische Zellen an den Ort des Geschehens zu locken. C5a wurde in diesem Zusammenhang im Kontext der Sepsis (Rittirsch et al., 2008), der Immunkomplexperitonitis (Godau et al., 2004), intracerebraler Hämorrhagie (Li et al., 2014) oder Rückenmarksverletzungen (Brennan et al., 2015) in der Literatur behandelt. Interessanterweise wurde C5a auch bereits im Kontext der Regulation der Angiogenese im inflammatorischen Milieu beschrieben (Conroy et al., 2009).

Die Anaphylatoxine wirken durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren. Bei den Anaphylatoxinrezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Sie setzen sich aus sieben Transmembrandomänen zusammen. Neben dem C5a-Rezeptor existiert für C5a noch ein weiterer Rezeptor, welcher als C5L2 (Gao et al., 2005) bezeichnet wird. Der C5a-Komplementrezeptor ist auf nahezu allen Immunzellen exprimiert, aber auch auf Endothelzellen (Haviland et al., 1995) und interessanterweise auch auf Thrombozyten (Meuer et al., 1981; Patzelt et al., 2015a; Nording et al., 2016).

1. Einleitung

1.4 Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine 1-4 µm große anukleäre Zellen, welche durch Abschnürung des Zytoplasmas von Megakaryozyten im Knochenmark gebildet werden. Obwohl sie keinen Kern haben, sind sie trotzdem eingeschränkt zur Proteinbiosynthese in der Lage (Lindemann et al., 2001), da sie manche mRNAs enthalten. Die durchschnittliche Überlebensdauer beträgt 5-12 Tage und die physiologische Konzentration im Blut liegt bei 150.000-300.000/µl beim Menschen. Blutplättchen enthalten α-Granula, dichte Granula und Lysosomen (Blair and Flaumenhaft, 2009). Die α-Granula enthalten zum Beispiel Platelet Derived Growth Factor (PDGF), platelet factor 4 (PF4) oder Fibronectin, die dichten Granula unter anderem Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Kalzium und Serotonin. Granula werden bei der Thrombozytenaktivierung sezerniert. Aufgrund der Vielzahl an Faktoren, welche Thrombozyten sezernieren können, haben sie auch eine Vielzahl an Funktionen (Rendu and Brohard-Bohn, 2001).

1.4.1 Thrombozyten in der primären Hämostase

Die klassische Funktion von Blutplättchen ist die als Schlüsselzelle der primären Hämostase. Wenn ein Gefäßschaden entstanden ist, muss dieser umgehend repariert werden, um Blutverlust aber auch das Eindringen von Erregern zu verhindern. Gleichzeitig muss aber die Durchgängigkeit von Gefäßen gewahrt bleiben. Dies erfordert eine feine Abstimmung, weswegen die Hämostase ein sehr komplexes System darstellt (Nording et al., 2015; Jackson, 2011; Etulain and Schattner, 2014; Hagedorn et al., 2010). Als sekundäre Hämostase wird die Stabilisierung eines Blutplättchen-Plaques durch das plasmatische Gerinnungssystem bezeichnet (Berndt et al., 2014). Eine Reihe von Oberflächenrezeptoren aber auch sekretierten Faktoren spielen in der plättchenvermittelten Hämostase eine wichtige Rolle. GPIbα (GP = Glykoprotein) ist ein Transmembranrezeptor, welcher auf der Oberfläche von Thrombozyten mit GPIX und GPV assoziiert ist (Andrews et al., 2007). Die Bindung von GPIbα an von-Willebrand-factor (vWF) ist der Ausgangspunkt der primären Hämostase. Durch Aufbrechen der inneren Endothelzellschicht eines Gefäßes wird auf Kollagen gebundener vWF für

1. Einleitung

Thrombozyten zugänglich, sodass GPIIb α binden kann. Dies führt zum sogenannten „rolling“ von Thrombozyten (Bergmeier et al., 2006). Damit Thrombozyten an der geschädigten Gefäßwand oder dem Areal eines Gefäßdefekt im Blutstrom binden können, muss ihre Adhäsion allerdings stabilisiert werden. Hierfür sind GPVI und sogenannte Integrine entscheidend (Nieswandt et al., 2009). GPVI ist ein Kollagenrezeptor auf der Oberfläche von Thrombozyten. Kollagen wird dann für Thrombozyten „sichtbar“, wenn ein Gefäßdefekt auftritt. Die Bindung von Kollagen an GPVI stabilisiert aber nicht nur die Thrombozytenbindung, sondern führt auch zur Aktivierung der Thrombozyten selbst (Moroi and Jung, 2004; Bergmeier and Stefanini, 2013). Dies führt unter anderem zur Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels in Thrombozyten und zur Verformung der Plättchen (Stefanini et al., 2012). Sie nehmen eine stechapfelartige Form an und interagieren miteinander. Diese Interaktion wird durch sekretierte Faktoren wie ADP und Thromboxan (Tx) A₂ (Huang et al., 2004; Jin et al., 1998; Offermanns, 2006) weiter verstärkt. Thrombozyten aktivieren sich also gegenseitig. Bei der Stabilisierung der Thrombozytenbindung spielen eine Reihe weiterer Faktoren und Oberflächenstrukturen wie C-type lectin-like type II (CLEC2) eine Rolle (Klement et al., 2009). Integrine sind entscheidend für die Bindung des thrombozytären Zytoskeletts an die extrazelluläre Matrix und ermöglichen damit deren Formänderung (shape change) (Nieswandt et al., 2009), rekrutieren aber auch weitere Plättchen und fördern deren Vernetzung. Diesen Prozess bezeichnet man als Aggregation (Nieswandt et al., 2009). Von zentraler Bedeutung hierfür ist das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ welches die mechanische Thrombozyt-Thrombozyt-Vernetzung mittels Fibrinogen-Brücken ermöglicht (Gawaz et al., 1991). Auf diese Weise wächst der Thrombus, wird stabiler und breitet sich über die gesamte Endothelschädigung aus. Die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (auch bezeichnet als GPIIb β_3) führt zum „outside-in signalling“, was zur weiteren Aktivierung der Thrombozyten mittels verschiedener Faktoren führt (Naik and Naik, 2003). Mittels Plättchenaktivatoren wie ADP lässt sich auch in vitro die Expression von GPIIb β_3 induzieren (Ozaki et al., 2005), was wiederum als „inside-out signalling“ bezeichnet werden kann.

1. Einleitung

Schließlich interagieren Thrombozyten auch auf vielfältige Weise mit dem plasmatischen Gerinnungssystem, sodass dessen Aktivierung, die sekundäre Hämostase, den gebildeten Thrombus mittels Fibrin stabilisiert (Munnix et al., 2007).

1.4.2 Thrombozyten als Immunzellen

Neben ihrer eben beschriebenen Rolle in der Blutgerinnung haben Thrombozyten eine Reihe immunologischer Funktionen, welche dazu geführt haben, Thrombozyten in manchen Kontexten als Immunzellen anzusehen (Semple et al., 2011; Nording et al., 2015).

Thrombozyten tragen zu vielfältigen Entzündungsprozessen bei (Nording et al., 2015). Sie sind unter anderem an der Erkennung von Krankheitserregern beteiligt, interagieren aber beispielsweise auch mit Bakterien selbst (Thon et al., 2012; Zhang et al., 2011). Außerdem erfüllen Thrombozyten immunmodulatorische Funktionen (Langer and Chavakis, 2009; Smyth et al., 2009; Langer et al., 2012). Hierbei spielt vor allem die Fähigkeit von Thrombozyten eine Rolle, Leukozyten zum Ort einer Entzündung zu rekrutieren. Eine detailliertere Darstellung dieser Plättchenfunktionen würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen. Es ist jedoch wichtig, auf die Bedeutung von Thrombozyten in der Atherosklerose hinzuweisen (Huo et al., 2003; Massberg et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Thrombozyten in jedem Stadium der Atherosklerose eine Rolle spielen (Nording et al., 2015). So tragen sie zu den ersten Schritten auf dem Weg zur Bildung eines atherosklerotischen Plaques bei, der endothelialen Dysfunktion (Massberg et al., 2002). Auch oxidierte Lipide, welche im Initialstadium der Atherosklerose zur Einleitung der vaskulären Entzündungsreaktion von großer Bedeutung sind, können auf der Oberfläche von Thrombozyten gebunden werden (Daub et al., 2010; Nording et al., 2016). Unter anderem mittels Freisetzung von Chemokinen tragen Thrombozyten zum Fortschreiten dieser vaskulären Erkrankung bei (Koenen et al., 2009). Auch die Freisetzung von sogenannten Mikropartikeln aus Thrombozyten, kleinen membranumschlossenen Partikeln, welche eine Reihe verschiedener Faktoren enthalten können, trägt zum Fortschreiten der Atherosklerose bei (Mause and Weber, 2010). Im atherosklerotischen Plug bleiben

1. Einleitung

Thrombozyten über lange Zeit aktiviert und erhalten die Entzündung durch langfristige Sekretion von Interleukin 1 β (Lindemann et al., 2001). Auch zur Ruptur eines vulnerablen atherosklerotischen Plaques, dem pathophysiologischen Endstadium der Atherosklerose, tragen Thrombozyten bei (Michelson et al., 2001).

Thrombozyten haben also über ihre Rolle in der Blutgerinnung eine Reihe weiterer physiologischer und pathophysiologischer Funktionen, unter anderem in der Atherosklerose.

1.4.3 Thrombozyten in der Angiogenese

Wie bereits dargestellt wurde, ist eine Beeinflussung der Endothelzellfunktion durch Thrombozyten vor allem unter inflammatorischen Bedingungen wie in der Atherosklerose gut etabliert (Nording et al., 2015; Gawaz et al., 2005). Endothelzellen sind die Schlüsselzellen der Angiogenese. In der Tat gibt es Hinweise darauf, dass auch die Angiogenese durch Thrombozyten moduliert wird (Patzelt and Langer, 2012). Vor allem Joseph Italiano et al. und Denisa Wagner et al. konnten zeigen, dass Thrombozyten in vivo eine Rolle spielen (Kisucka et al., 2006; Italiano et al., 2008). Italiano et al. konnten zeigen dass Plättchenvesikel auch pro- und antiangiogene Faktoren enthalten, welche in separaten Vesikeln gespeichert sind, und auf spezifische Stimuli hin differenziell freigesetzt werden können (Battinelli et al., 2011; Italiano et al., 2008). Dies legt nahe, dass Thrombozyten Modulatoren der Angiogenese sind. Zum Beispiel enthalten Thrombozyten proangiogenes VEGF und antiangiogenen platelet factor 4 (PF-4) (Stellos et al., 2010; Klement et al., 2009; Chatterjee et al., 2011). Wie genau Thrombozyten mittels dieser Faktoren die Angiogenese in-vivo modulieren, ist allerdings weitgehend unbekannt (Ma et al., 2005; Italiano et al., 2008). Wagner et al. haben diesbezüglich zeigen können, dass Thrombozyten nicht nur die Angiogenese fördern, sondern dass sie auch die Permeabilität der so neu entstandenen Blutgefäße steuern können (Kisucka et al., 2006).

Prinzipiell sind drei Mechanismen bekannt, über die Thrombozyten die Endothelfunktion bei der Angiogenese beeinflussen können. Erstens ist dies die bereits genannte Freisetzung von pro- und antiangiogenen Faktoren aus den α -

1. Einleitung

Granula der Thrombozyten. Zweitens können Thrombozyten über eine direkte Rezeptor-Liganden-Bindung mit den Endothelzellen interagieren. Drittens ist bekannt dass von Thrombozyten freigesetzte Mikropartikel die Funktion von Endothelzellen modulieren können (Patzelt and Langer, 2012).

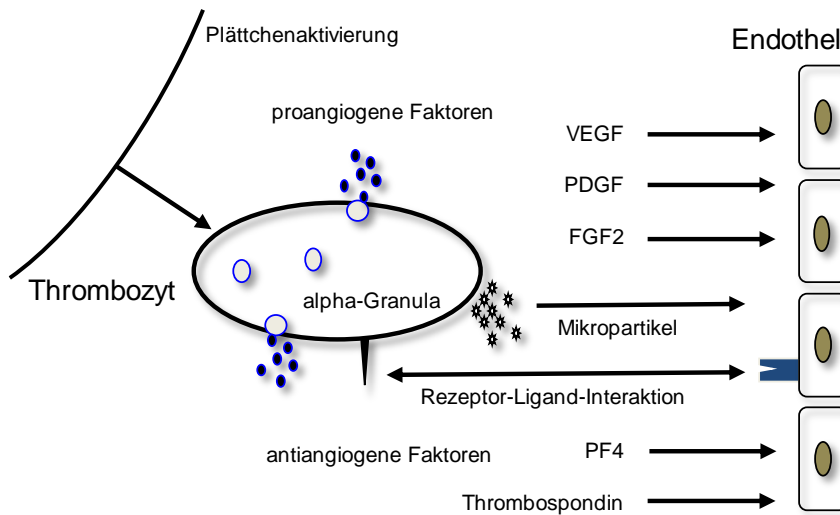


Abb. 4: **Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen in der Angiogenese**

Die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen in der Angiogenese kann mittels unterschiedlicher Wege stattfinden. Zum einen mittels Sekretion von Faktoren, mittels direkter Zell-Ligand-Interaktion oder mittels Sekretion von Mikropartikeln aus Thrombozyten (Patzelt and Langer, 2012).

1.4.4 Thrombozyten und das Komplementsystem

Bereits vor vielen Jahren wurde gezeigt, dass Thrombozyten Komplementrezeptoren exprimieren (Grossklaus et al., 1976; Becker et al., 1978; Meuer et al., 1981). Es wurde auch gezeigt, dass diese Rezeptoren funktionelle Bedeutung haben und beispielsweise die Serotonin-Freisetzung (Meuer et al., 1981) oder die Plättchenaggregation (Grossklaus et al., 1976) hierüber reguliert werden kann. Thrombozytenaktivierung kann ebenfalls die Aktivierung des Komplementsystems induzieren (Martel et al., 2011). Neuere Daten aus einer großen Patientenkohorte zeigen, dass es eine starke Korrelation zwischen der Expression des Plättchenaktivierungsmarkers P-Selektin und des C5a-Komplementrezeptors auf Thrombozyten bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung gibt (Patzelt et al., 2015b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die C5a-Level im Plasma von

1. Einleitung

Patienten invers mit plättchengebundenem oxLDL korrelieren, welches in der Atherosklerose von Bedeutung ist (Nording et al., 2016). Auch zwischen dem plasmatischen Gerinnungssystem und dem C3a-Rezeptor besteht eine funktionelle Verbindung (Verschoor and Langer, 2013).

1.5 Fragestellung

Es existieren eine Reihe von Hinweisen darauf, dass Komplementsystem und Thrombozyten interagieren. Diese Interaktion scheint auch bei kardiovaskulären Erkrankungen von Bedeutung zu sein (Nording et al., 2016; Patzelt et al., 2015b). Auch in der Angiogenese spielen Thrombozyten eine Rolle (Italiano et al., 2008). Ein genauer Mechanismus für eine thrombozytenvermittelte Modulation der Angiogenese ist aber bisher nicht beschrieben worden. Da auch das Komplementsystem in der Angiogenese eine Rolle zu spielen scheint (Langer et al., 2010), stellt sich die Frage, ob Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von Thrombozyten einen Mechanismus darstellen, wie Angiogenese durch Thrombozyten moduliert wird. Diese Fragestellung soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen in einer SPF-Tierhaltung mit moderater Trockenbarriere und strengen Zugangsregeln für Wissenschaftler und einzubringende Tiere sowie engmaschigem Hygienemonitoring gehalten. Generell erfolgte die Haltung in Gruppen à 4 Mäuse in Typ II long Käfigschalen auf Einstreu mit Futter und Wasser ad libitum. Alle Käfige waren mit Nestbaumaterial (Zellstoff) und weiterem Environmental Enrichment (Holzröhren o.ä.) ausgestattet. Es wurde ein regelmäßiger 12h-Lichtzyklus täglich eingehalten. Männliche Tiere wurden nach einem Eingriff in Einzelhaltung gehalten, die Weibchen in ihren angestammten Gruppen. Alle Mäuse wurden intensiv beobachtet und täglich gewogen, um ausreichende Wasser- und Nahrungsaufnahme zu kontrollieren und Hinweise auf mögliche Infektionen zu erhalten. Alle Experimente wurden gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz und der Tierversuchs-Verordnung und nur nach Genehmigung der zuständigen Tierschutz-Kommission durchgeführt.

Als Wildtyp (WT) Mäuse wurden in dieser Arbeit Mäuse vom Stamm C57BL/6J verwendet. Diese stammen ursprünglich von den Jackson Laboratories, wurden aber für Versuchszwecke in unserer Tierhaltung selbst gezüchtet. Mäuse ohne funktionellen C5a-Komplement-Rezeptor wurden freundlicherweise durch Dr. C. Gerard von der Harvard Medical School (Boston, USA) zur Verfügung gestellt und in unserer Tierhaltung auf C57/Bl6-Hintergrund gezüchtet. Diese C5aR-Knockout-Mäuse wurden bereits in der Literatur beschrieben (Hopken et al., 1996; Phieler et al., 2013).

Tabelle 1: Verwendete Mauslinien und ihre Herkunft

Stammbezeichnung	Bezugsquelle
C57Bl/6J	Jackson Laboratories, USA
C5aR-Knockout	Dr. C. Gerard, Harvard Medical School, Boston, USA

2. Material und Methoden

2.2 Isolierung von Thrombozyten

2.2.1 Thrombozytenisolierung aus humanem Blut

Die Gewinnung humaner Thrombozyten wurde nach bereits publizierten Protokollen durchgeführt (Nording et al., 2016; Langer et al., 2006). Zur Blutentnahme wurde die V. mediana cubiti oder C. cephalica gesunder freiwilliger Probanden mittels einer Butterfly-Kanüle (Safety-Multifly® Set, Sarstedt, Nürnberg) punktiert und das Blut vorsichtig in eine mit 4ml ACD-Puffer gefüllte 20 ml Spritze aspiriert. Die Zusammensetzung von ACD-Puffer entnehmen Sie bitte unten stehender Tabelle. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Blut sich mit dem ACD-Puffer gut vermischt, um eine sofortige Gerinnungshemmung zu erreichen. Anschließend wurde das Blut in zwei 15 ml-Falcons aufgeteilt und 20 Minuten bei 430 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wird als thrombozytenreiches Plasma (platelet rich plasma, PRP) bezeichnet. Für manche Versuche wurde das PRP direkt verwendet. Die Konzentration an Thrombozyten wurde mittels eines Sysmex-Zytometers (Sysmex KX-21N, Görlitz) gemessen. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (2000 g, 10 Minuten, mit Bremse) wurde sogenanntes thrombozytenarmes Plasma (PPP) hergestellt. Die Thrombozytenkonzentration des PRP wurde durch Zugabe von PPP auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Für die Herstellung sogenannter gewaschener Thrombozyten wurde das PRP mit einer Transferpipette an der Oberfläche abgenommen, in 50 ml-Falcon-Gefäßen auf 35 ml mit Tyrodes Puffer pH 6,5 aufgefüllt und 10 Minuten bei 900 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zusammensetzung von Tyrodes-Puffer entnehmen Sie bitte unten stehender Tabelle. Der Überstand wurde verworfen, das Thrombozytenpellet je nach Bedarf mit Tyrodes pH 6,5 resuspendiert und Tyrodes pH 7,4 in gleichem Verhältnis hinzugegeben. Die Thrombozytenkonzentration wurde mit einem Sysmex-Zytometer gemessen. Die Zellen wurden je

2. Material und Methoden

nach Bedarf auf die gewünschte Konzentration mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 eingestellt, welcher mit Kalziumchlorid 1 mM versetzt worden war. Die Thrombozyten wurden dann sofort für Versuche verwendet.

Tabelle 2: Zusammensetzung von ACD-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
ACD-Puffer	12,5 g Natriumcitrat 6,82 g Zitronensäure 10 g Glukose 500 ml Aqua dest. mit NaOH auf pH 4,7 einstellen

Tabelle 3: Zusammensetzung von Tyrodes-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Tyrodes-Puffer	HEPES 2,5 mM Natriumchlorid 150 mM Kaliumchlorid 1 mM Natriumhydrogencarbonat 2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,36 mM Glukose 5,5 mM BSA 1 mg/ml mit HEPES auf pH 7,4 einstellen 50 ml abnehmen den Rest mit HCl auf pH 6,5 einstellen

2.2.2 Thrombozytenisolierung aus murinem Blut

Zur Blutentnahme wurde die Maus mit Isofluran (Trärgas 100% Sauerstoff 1ml/mg, cp pharma, Burgdorf) narkotisiert, und Blut aus dem Herzen der Maus

2. Material und Methoden

mittels einer 21G-Kanüle (Braun, Melsungen) in eine mit 300 µl ACD-Puffer vorbereitete 5ml-Spitze abgenommen. Anschließend wurde das Blut in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) überführt und bei 120 g für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Das PRP wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Tyrodes-Puffer pH 6,5 auf 2 ml aufgefüllt und bei 2600g für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet je nach gewünschter Konzentrierung in bis zu 250 µl Tyrodes-Puffer pH 6,5 resuspendiert und mit einem gleichen Teil Tyrodes-Puffer pH 7,4 gemischt. Dann wurde die Thrombozytenzahl mit einem Sysmex-Zytometer (Sysmex KX-21N, Görlitz) gemessen und die Konzentration mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 eingestellt, welcher mit Kalziumchlorid 1 mM versetzt worden war. Die Thrombozyten wurden dann sofort für Versuche verwendet. Im Folgenden werden die so gewonnenen Blutplättchen als gewaschene Thrombozyten bezeichnet.

2.2.3 Stimulation humaner Thrombozyten

Humane Thrombozyten in PRP wurden für eine durchflusszytometrische Analyse auf die Konzentration 20.000/µl eingestellt und mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich), oxLDL (20µg/ml, Kalen Biomedical, LLC, Montgomery Village, USA), ADP (0,1mMol, Chrono-Log Corporation, Havertown, USA), Kollagen (2,5 µg/ml, Takeda, Linz, Austria) für 30 Minuten bei 37°C stimuliert.

2.2.4 Gewinnung von Thrombozytenüberstand

Gewaschene murine Thrombozyten wurden auf die Konzentration 1.000.000 Zellen/µl eingestellt und mit C5a (R&D, Minneapolis, USA) in der Konzentration 10 nM für 10 min bei 37°C stimuliert, wie dies bereits in der Literatur für die C5a-Stimulation anderer Zelltypen beschreiben wurde. (Langer et al., 2010). Der Überstand wurde daraufhin gewonnen, indem die Suspension bei 20.000 g bei 4°C für 4 Minuten zentrifugiert wurde und der Überstand abgenommen wurde, wobei das Pellet verworfen wurde.

2. Material und Methoden

2.3 In vivo Matrigelplug-Assay

Als in vivo Angiogenese Assay wurde für diese Arbeit der Matrigelplug-Assay durchgeführt, wie er bereits in der Literatur beschrieben wurde (Langer et al., 2010). Die Stärke dieser Methode liegt in ihrer Vielseitigkeit. Matrigel ist eine solubilisierte Präparation der Basalmembran. Die Hauptkomponenten sind Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat, Proteoglykane und Entactin (Benton et al., 2014). Dieses Produkt wird häufig für in vivo Studien von Angiogeneseprozessen verwendet. Hierbei lässt sich die Tatsache ausnutzen, dass Matrigel bei 4°C flüssig ist und bei Körpertemperatur schnell zu einem gelartigen soliden Plug geliert, um so subkutan eine Matrix für vom Wirt einsprossende Gefäße zu schaffen.

Zwei Aliquots (0,5 ml) Matrigel (Corning Inc, Corning, USA) wurden mit rekombinantem Hirudin (22,4 U/ml, Merck, Darmstadt) versetzt, um die intravasale Gerinnung im Matrigelplug zu unterbinden und das Einsprossen durchgängiger Gefäße zu ermöglichen. Hirudin wurde, anders als in vielen anderen Beschreibungen dieser Methode, hier als Antikoagulans verwendet, da bekannt ist, dass Heparin die Komplementaktivierung inhibiert und es in dieser Arbeit um die Rolle eines Komplementrezeptors in der Angiogenese gehen soll (Girardi et al., 2004). Außerdem komplexiert Heparin mit dem antiangiogenen platelet factor 4 (PF4), welches ein in Thrombozyten stark enthaltener angiogen aktiver Faktor ist (Eslin et al., 2004). Da im Rahmen dieser Arbeit mit dieser Methode wachstumsfaktor-induzierte Angiogenese untersucht werden sollte, wurde das Matrigel zusätzlich mit 150 ng/ml des endothelialen Wachstumsfaktors bFGF (Peprotech, Rocky Hill, USA) versetzt.

In manchen Experimenten wurde das Matirgel vor Injektion zusätzlich mit frisch isolierten gewaschenen Thrombozyten aus WT oder C5aR-Knockout-Mäusen versetzt (100.000.000 Thrombozyten/ml Matrigel).

Die vorbereiteten Matrigel-Aliquots wurden subkutan (21G Kanüle, Braun, Melsungen) in die mitt-abdominelle Region von 6 bis 12 Wochen alten Mäusen injiziert, jeweils zwei Plugs pro Maus. Hierfür wurden die Tiere in Isofluran-Narkose gelegt. Die Narkose wurde so lange aufrechterhalten, dass die Plugs sicher ausgehärtet waren, bevor sich die Mäuse wieder bewegten. Nach einer Woche,

2. Material und Methoden

an Tag 8, wurden die Tiere durch Genickbruch in tiefer Isoflurannarkose getötet. Zur histologischen Auswertung werden die Matrigelplugs vorsichtig mit der sie umgebenden Haut entnommen, und mittels 0,25% Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) fixiert. Die weitere histologische Aufarbeitung ist unter 2.4 beschrieben.

2.3.1 Systemische Thrombozytendepletion in vivo

In einigen Experimenten wurden parallel zur Injektion von Matrigel die Thrombozyten der Mäuse systemisch depletiert, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Kraft und Kleinschnitz, 2016; Langer et al., 2012; Schleicher et al., 2015). Hierzu wurde Thrombozytendepletionsserum (10µl verdünnt in 200µl PBS, rabbit anti-mouse antiplatelet serum, Accurate Chemical and Scientific, Westbury, USA) 12 Stunden nach Matrigel-Injektion und an Tag 5 intraperitoneal injiziert. Der Kontrollgruppe wurde ein Kontroll-Serum (rabbit serum, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in gleicher Konzentration injiziert.

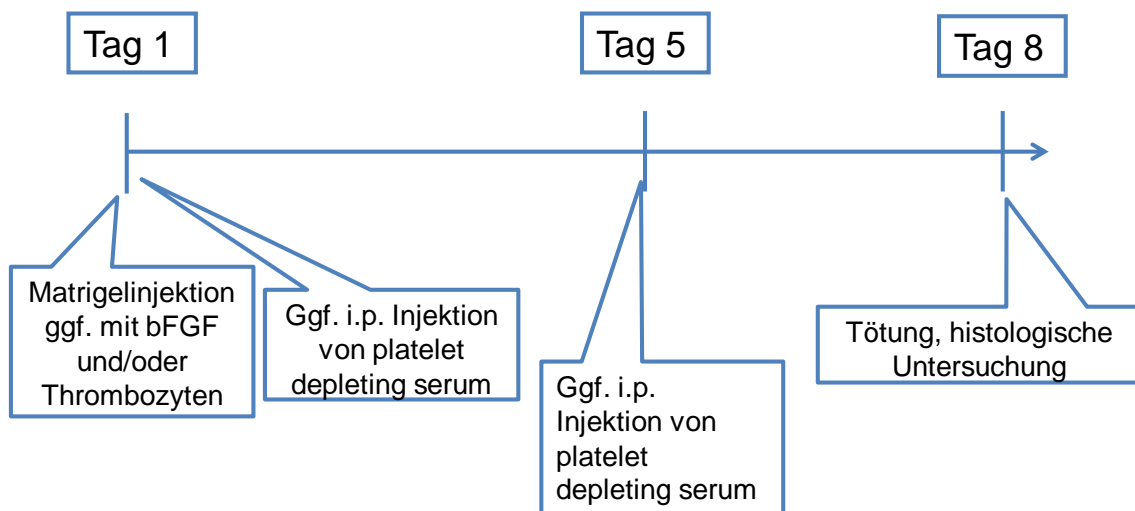


Abb. 5: **Zeitlicher Ablauf der Matrigelversuche**

2.3.2 Systemische PF4-Inhibition in vivo

In weiteren Versuchen wurde ein blockierender anti-PF4-Antikörper verwendet, welcher die Wirkung von PF4 in vivo inhibiert, wie bereits in der Literatur

2. Material und Methoden

beschrieben wurde (Hartwig et al., 2013). Dieser Antikörper wurde in einer Konzentration von 10 µg/Maus verwendet und intravenös in die Schwanzvene injiziert (rat anti-mouse IgG2b, Klon 140910, R&D, Minneapolis, USA). Die Kontrollgruppe erhielt ein Kontroll-IgG (control IgG2b, BioLegend, San Diego, USA).

2.3.3 Auswertung und Quantifizierung

Wie unter 2.4 beschrieben, wurden die Matrigelplugs mittels eines Kryotoms geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Es wurden jeweils 5 Schnitte pro Matrigelplug angefertigt, welche mindestens 500 µm auseinander lagen. Diese wurden dann im Ganzen mittels der Funktion „Large image acquisition“ der Software Nikon NIS elements BR (v.3.2, Nikon Instruments, Tokyo, Japan) aufgenommen. Hierfür wurde ein Nikon Optishot-2 Mikroskop ausgestattet mit einem 2x plan-apochromat (N.A. 0,08) Objektiv verwendet. Die verwendete Kamera war eine digital sight DS-5M Kamera von Nikon (Tokyo, Japan). Die bereits genannte Nikon-Software wurde auch zur Bildanalyse verwendet. Anhand der Farb- und Helligkeitsintensitäts-Werte wurde die Fläche der Zellkerne pro Matrigel-Fläche als Annäherungsmaß der Gefäßfläche pro Matrigelplug berechnet.

2.4 Hindlimb-ischemia-Assay

Die Methode der Hindlimb-ischemia erlaubt es, hypoxiegetriggerte Angiogenese zu untersuchen. Dies ist besonders wichtig, da Hypoxie nicht nur in pathophysiologischen Kontexten als Induktor von Angiogenese von großer Bedeutung ist (s. 1.2.1). Hierbei wird mittels Ligation der Femmoralarterie einer der Hinterläufe einer Maus Ischämie in der abhängigen Extremität induziert, welche dann dort Gefäßneubildung triggert. Um eine standardisierte Versuchsdurchführung zu gewährleisten, haben wir ein bereits veröffentlichtes Protokoll verwendet (Limbourg et al., 2009).

2. Material und Methoden

2.4.1 Operatives Vorgehen

Jede Maus wurde vor der Versuchsdurchführung gewogen. Es erfolgte dann eine Allgemeinanästhesie durch eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion von Medetomidin (500µg/kg, Eurovet, Bladel, Niederlande), Midazolam (5mg/kg, Siegfried Hameln, Hameln) sowie Fentanyl (50µg/kg, Actavis, Zug, Schweiz) i.p. in einer Mischspritze. Die weitere Narkoseerhaltung erfolgte mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Trärgas 100% Sauerstoff 1ml/mg, cp pharma, Burgdorf). Zur Vermeidung des intraoperativen Auskühlens der Maus, wurde das Tier während der Narkose auf einer Wärmematte fixiert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums der Anästhesie, welches durch das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes überprüft wurde, wurde das Operationsfeld mithilfe von Enthaarungscreme rasiert (2x1 cm). Es wurde dann eine circa 1 cm lange Inzision über der Arteria femoralis des linken Hinterlaufes von proximal nach distal geschaffen. Die Arteria femoralis wurde dann so freipräpariert und von Nerv und Vene mobilisiert, dass sie mit einem Ethylen-Faden 8.0 (Ethilon, Ethicon, Sommerville, USA) proximal und distal angeschlungen und anschließend ligiert werden konnte. Die operative Wunde wurde mittels subkutanen und intrakutanen Knopfnähten (Prolene 6.0, Ethicon, Sommerville, USA) verschlossen.

2.4.2 Laserdoppler-Fluximetrie

Die Laser-Doppler-Fluximetrie erlaubt eine kontinuierliche, nicht-invasive und semiquantitative Erfassung der Gewebemikrozirkulation. Das Prinzip basiert auf dem Doppler Effekt, wobei das von einem Helium-Neon Laser emittierte Licht von bewegten Strukturen, vor allem den Erythrozyten, reflektiert wird (Limbourg et al., 2009). Für die Arbeit wurde eine moorLDI2-HIR Laserdoppler-Imaging-Einheit verwendet (LDI, Moor Instruments, Axminster, UK). Bei einem Scan-Vorgang wird das Bein der Maus durch einen Laserstrahl abgetastet. Die Maus wurde dafür etwa 30 cm unterhalb des Laseraustritts mittels Klebestreifen fixiert. Die Eindringtiefe des Laserstrahls beträgt ungefähr 1-2mm und reflektiert somit den nutritiven (kapillären) und den thermoregulativen (arteriolären und venolären) Blutfluss. Jede Maus wurde präoperativ nach Applikation der Narkose gescannt

2. Material und Methoden

und unmittelbar postoperativ nach Wundnaht, solange die Maus sich noch in Narkose befand. Hierdurch erfolgte die Erfolgskontrolle, ob die Ligation erfolgreich gewesen ist. Jeder Scan-Vorgang dauerte etwa 3-5 Minuten. Die Narkose war hierfür wichtig, denn die Maus darf sich während des gesamten Vorgangs nicht bewegen.

Ein Scan mittels LDI erfolgte erneut am 3., 5., 7., 9., 11. und 15. Versuchstag (Abb. 6) bzw. am 3., 5., 7 Versuchstag (Abb. 7), wenn ebenfalls die Thrombozyten systemisch depletiert wurden, wie unter 2.3.1 beschrieben wurde. Hierzu mussten die Tiere erneut in eine kurze Narkose versetzt werden. Es erfolgte eine Allgemeinanästhesie mit Medetomidin (500µg/kg, Eurovet, Bladel, Niederlande) und Midazolam (5mg/kg, Siegfried Hameln, Hameln) in einer Mischspritze. Eine Abschirmung mit Opiaten war hierfür nicht erforderlich, da der Scan-Vorgang keinerlei Schmerzen verursacht. Auch diese Narkose wurde nach Beendigung des Scan-Vorgangs (3-5 Minuten) antagonisiert (s. 2.4.3).

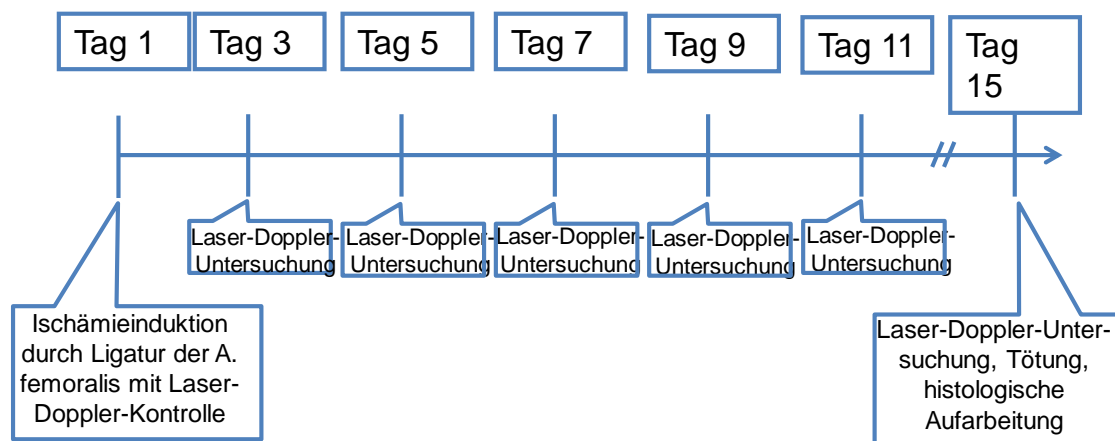


Abb. 6: **Zeitlicher Ablauf der Hindlimb-ischemia-Versuche ohne systemische Thrombozytendepletion**

2.4.3 Postoperative Versorgung und Probenaufbereitung

Nach Abschluss des Scan-Vorgangs wurden die Mäuse aus der Narkose ausgeleitet. Hierzu wurde die Narkose antagonisiert. Um postoperativ eine ausreichende Flüssigkeitsversorgung zu gewährleisten, wurde jeder Maus zuvor ein Gesamtvolumen von 0,01 ml pro g Körpergewicht aus 0,9%-NaCl-Lösung und 5%iger Glucoselösung im Verhältnis 1:1 s.c. appliziert. Diese Gabe erfolgte direkt

2. Material und Methoden

postoperativ und wurde am Abend des OP-Tages wiederholt. Zur s.c.-Injektion wurden 25G Kanülen (Braun, Melsungen) verwendet. Eine postoperative Wärmeversorgung wurde bis zum Aufwachen der Mäuse, was nach Antagonisierung der Narkose schnell eintrat, unter adäquatem Augenschutz mittels Rotlicht gewährleistet. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte mittels s.c.-Injektion von Atipamezole (2,5 mg/kg, Zoetis, Parsippany-Troy Hills Township, USA) und Flumazenil (0,5 mg/kg, Fresenius Kabi, Bad Homburg). Das Opiat wurde hierbei bewusst nicht antagonisiert, um keine postoperative Schmerzkrise auszulösen. Die Mäuse erholten sich unter der Wärmelampe von der Narkose. Zur zusätzlichen Abschirmung wurde vor Injektion der Antagonisierung Buprenorphin s.c. (Temgesic, Schering Plough, Kenilworth, USA) in einer Dosierung von 0,05 mg/kg Körpergewicht appliziert. Eine erneute Injektion erfolgte in gleicher Dosierung am Abend des OP-Tages. Bei unzureichender Wirkung wurde die Dosis auf bis zu 0,1 mg/kg gesteigert. Die postoperative Schmerztherapie wurde auf diese Weise am ersten und zweiten postoperativen Tag fortgeführt. Es erfolgte eine Applikation des Analgetikums alle 8 Stunden, d.h. dreimal pro Tag. Die Tiere wurden nach den Eingriffen in Einzelhaltung auf Einstreu gehalten sowie intensiv vor allem auf Anzeichen von Schmerzen hin beobachtet und täglich gewogen, um ausreichende Wasser- und Nahrungsaufnahme zu kontrollieren sowie Hinweise auf mögliche Infektionen zu erhalten. Allen Tieren standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden so bis zu 14 Tagen postoperativ gehalten. In dieser Zeit wurde die Revaskularisation des Hinterlaufs mittels regelmäßiger LDI-Scans gemessen, wie bereits beschrieben.

In einem Experiment wurde zusätzlich am ersten postoperativen Tag Thrombozytendepletionsserum i.p. appliziert, wie unter 2.3.1 beschrieben. Dieses Experiment wurde lediglich bis zum 6. postoperativen Tag fortgeführt (Abb. 7).

2. Material und Methoden

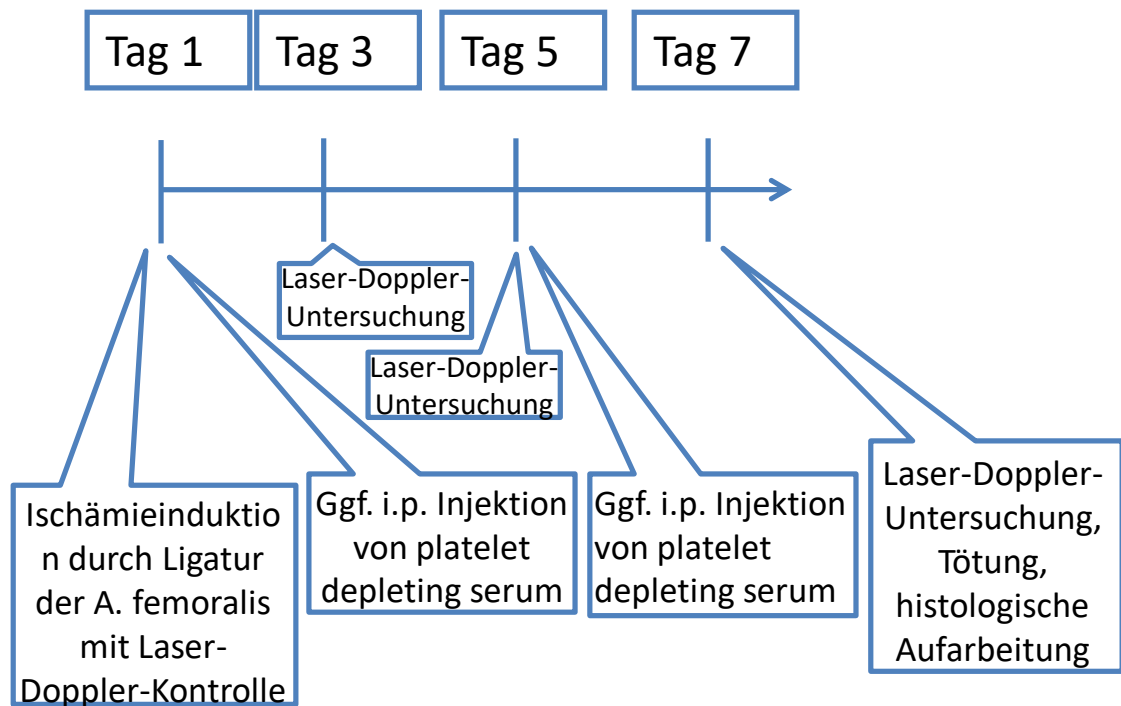


Abb. 7: Zeitlicher Ablauf der Hindlimb-ischemia-Versuche mit systemischer Thrombozytendepletion

Für den letzten Scan am 15. Versuchstag erfolgte die Narkose erneut durch eine intraperitoneale Injektion von Medetomidin (500 μ g/kg), Midazolam (5mg/kg) sowie Fentanyl (50 μ g/kg) i.p. in einer Mischspritze. Nach Beendigung des Scanvorgangs erfolgte in tiefer Narkose die Perfusion der Mäuse mittels körperwarmem 0,9%-NaCl. Hierzu wurde das linke Herz kanüliert, das rechte Herz eingritz und 20 ml Flüssigkeit durch das Gefäßsystem perfundiert, was etwa eine Minute in Anspruch nahm. Daraufhin erfolgte die Tötung der Maus mittels Genickbruch. Nun wurden beidseits die Gastrocnemius-Muskeln entnommen und histologisch aufgearbeitet, wie unter 2.5 beschrieben. Die Kapillardichte der Gastrocnemius-Muskeln wurde mittels CD31-Immunfluoreszenzfärbung bestimmt (s. 2.5.2). Es wurde die Anzahl CD31-positiver Strukturen pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung quantifiziert. Hierfür wurden 10 Schnitte verwendet, welche jeweils 200 μ m auseinanderlagen. Pro Schnitt wurden 5 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder quantifiziert.

2. Material und Methoden

2.5 Histologie

Matrigelplugs wurden fixiert, wie unter 2.3 beschrieben und dann in O.C.T. Tissue Tek (Sakura, Staufen) eingebettet und bei -20°C eingefroren. Histologische Schnitte von Matrigelplugs wurden bei einer Schichtdicke von 10 µm mit einem Kryostat der Firma Leica (CM3050, Leica, Nussloch) angefertigt.

Gastrocnemius-Muskeln aus Tieren aus dem Hindlimb-ischemia-Assay wurden nach der Explantation in kaltem neutral gepuffertem 4%-Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) für 4 Stunden fixiert. Danach wurden auch sie in O.C.T. Tissue Tek (Sakura, Staufen) eingebettet und bei -20°C eingefroren. Die Muskeln wurden mit einer Schichtdicke von 8 µm geschnitten.

2.5.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin/Eosin-Färbung (H&E) werden Zellkerne mittels Hämatoxylin dunkelblau gefärbt, während das Zytoplasma durch das Eosin rötlich erkennbar wird. Das verwendete Protokoll für diese Färbung ist im Folgenden aufgeführt: Bei dem hier verwendeten Protokoll wurden die Schnitte zunächst mindestens 30 Minuten aufgetaut. Dann folgte ein Permeabilisierungsschritt in 4% neutral gepuffertem PFA für 30 Minuten. Dann wurden die Schnitte in deionisiertem Wasser (ddH₂O) für 5 Minuten gewaschen und 5 Minuten in Hämalaun gefärbt (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Roth, Karlsruhe). Daraufhin wurden die Schnitte unter laufendem kaltem Leitungswasser für 15 Minuten gebläut. Dann folgte die Eosin-Färbung für 3 Minuten in 1% Eosinlösung (Roth, Karlsruhe), welche mit einem Tropfen Eisessig gesäuert war, um das alkalische Bläuen abzuhalten. Dann wurden die Schnitte in ein organisches Medium mittels einer Alkohol-Konzentrationsreihe überführt. Zuerst folgte ein kurzer Waschschrift in ddH₂O für 10 Sekunden, dann jeweils 5 Sekunden in 70%, 80% und 90% Ethanol. Dann folgten zwei Inkubationsschritte in 100% Ethanol für 5 Minuten. Schließlich wurden die Schnitte 3 Minuten in RotiHistol (Roth, Karlsruhe) vorbereitet und mit RotiHistokit (Roth, Karlsruhe) eingedeckelt.

2. Material und Methoden

2.5.2 Immunfluoreszenz-Färbungen

Gastrocnemius-Muskel-Schnitte wurden ebenfalls mittels Immunfluoreszenz-Färbung auf den Endothelzellmarker CD31 untersucht. Hierzu wurden die Schnitte für 10 Minuten mit eiskaltem Aceton (Merck, Darmstadt) permeabilisiert und mit 10% Ziegen-Serum (Gibco goat serum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und 1% BSA (bovine serum albumin, bovines Serumalbumin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurden die Schnitte mit Hase-antiCD31-Antikörper (1:20, Abcam, Cambridge, UK) in 1% BSA für 14 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit 0,05% Tween-PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und erneut mit 10% Ziegen-Serum (Gibco goat serum, Thermo Fisher Scientific) und 1% BSA (Thermo Fisher Scientific) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Als Sekundär-Antikörper wurde ein AlexaFluor-488-konjugierter Ziegen-anti-Hase-Antikörper (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit verwendet. Daraufhin wurde erneut mit PBS gewaschen und schließlich eine Zellkernfärbung mit DAPI (1:3000, Sigma-Aldrich) für 3 Minuten durchgeführt.

Tabelle 4: Für die Immunfluoreszenzfärbung verwendete Puffer

Puffer-Bezeichnung	Zusammensetzung
PBST Puffer (0,1% Tween)	1000 ml Aqua dest. 2 Stück PBS Tabletten (Invitrogen) 1 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich)
0,05% Tween-PBS	1000 ml Aqua dest. 2 Stück PBS Tabletten (Invitrogen) 0,5 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Für die Visualisierung der Ko-Lokalisation des Thrombozytenmarkers CD41 und des C5a-Rezeptors (CD88) wurden Schnitte nach dem bereits beschriebenen Protokoll fixiert und mit 1% BSA (Thermo Fisher) mit Zusatz von 0,1% Glycin

2. Material und Methoden

(Sigma-Aldrich) in PBST (s. Tabelle 4) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die Schnitte wurden daraufhin mit dem ersten Primärantikörper, Ziege-anti-Maus-CD88-Antikörper (1:200, Santa Cruz, Dallas, USA), in 1% BSA in PBST für 14 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit PBS wurde der erste Sekundärantikörper aufgebracht, AlexaFluor 488-konjugierter Esel-anti-Ziege-Antikörper (1:500, Invitrogen, Carlsbad, USA), für 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Danach folgte ein weiterer Waschschriff mit PBS, ein weiterer Blockierungs-Schritt und dann wurden die Schnitte mit dem zweiten Primärantikörper, Ratte-anti-Maus-GPIIb-Antikörper (Klon POP-B, 1:50, Emfret Analytics, Eibelstadt, Germany), in 1% BSA in PBST für 14 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit PBS wurde der zweite Sekundärantikörper aufgebracht, AlexaFluor 568-konjugierter Ziege-anti-Ratte-Antikörper (1:500, Invitrogen, Carlsbad, USA), für 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Danach folgte ein weiterer Waschschriff mit PBS und schließlich wurde noch eine Zellkernfärbung mit DAPI (1:3000, Sigma-Aldrich), wie oben bereits beschrieben, durchgeführt.

Bei allen Färbungen wurden jeweils Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper und mit einem zum jeweiligen Primärantikörper passenden Kontroll-IgG-Antikörper durchgeführt. Die hierfür verwendeten Antikörper finden sich in Tabelle 5.

2.5.3 Mikroskopie

Die mittels Immunfluoreszenz gefärbten Schnitte wurden mit Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako, Agilent, Santa Clara, USA) und Deckgläschen eingedeckelt und getrocknet. Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 40x mit einem Axioplan II FS spinning disk Mikroskop (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena) aufgenommen, welches ein Wasserimmersionsobjektiv besitzt und mittels Live Acquisition Software (FEI, München) gesteuert wird. Ausgewertet und analysiert wurden die Aufnahmen mit der Software ImageJ (National Institute of Health, NIH, Bethesda, USA).

2. Material und Methoden

Tabelle 5: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Hase-antiCD31-Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
Polyklonale Hase-IgG-Isotyp-Kontrolle	Abcam, Cambridge, UK
Ziege-anti-Maus-CD88-Antikörper	Santa Cruz, Dallas, USA
Polyklonale Ziege-IgG-Isotyp-Kontrolle	Abcam, Cambridge, UK
Ratte-anti-Maus-GPIIb-Antikörper (Klon POP-B)	Emfret Analytics, Eibelstadt
Ratte-anti-Maus-Kontroll-GPIIb-Antikörper (POP-B)	Zur Verfügung gestellt von Bernhardt Nieswandt, Würzburg
Sekundärantikörper:	
AlexaFluor-488-konjugierter Ziegen-anti-Hase-Antikörper	Invitrogen, Carlsbad, USA
AlexaFluor 488-konjugierter Esel-anti-Ziege-Antikörper	Invitrogen, Carlsbad, USA
AlexaFluor 568-konjugierter Ziege-anti-Ratte-Antikörper	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.6 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht es, Zellen in Suspension quantitativ zu analysieren (Givan, 2001) anhand der Streuung eines Laserstrahls an der Zelle selbst oder mittels fluoreszierender Antikörper, die an spezifische Marker auf der Zelloberfläche binden. Die Zellen fließen in einer Trägerflüssigkeit durch den Laserstrahl. Dabei wird das Streulicht gemessen. Hierbei unterscheidet man das nach vorne abgelenkte Licht, das im „*Forwardscatter*“-Detektor (FSC) gemessen wird und Informationen über die Größe der Zellen liefert, von dem im 90°-Winkel abgelenkten Seitwärtsstreulicht, das im „*Sidescatter*“-Detektor (SSC) gemessen wird und die Granularität der Zellen charakterisiert. Über

2. Material und Methoden

diese auch ohne Fluoreszenzmarkierung mögliche Messung der Zelleigenschaften hinaus, können Zellen mit Antikörpern markiert werden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen gelabelt sind, um einzelne Oberflächenantigene der Zellen sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Am gebräuchlichsten sind die Farbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Diese emittieren Licht nach Anregung durch das monochromatische Licht des Lasers in einer für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge. Die Fluoreszenz einer Zelle nimmt dabei proportional zur Anzahl der von einer Zelle spezifisch gebundenen farbstoffkonjugierten Antikörper zu.

2.6.1 Durchflusszytometrische Analyse der C5aR-Expression auf Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten wurden frisch aus dem Blut von WT-Mäusen gewonnen, wie unter 2.2.2 beschrieben. Daraufhin wurde eine Blockierung unspezifischer Bindungen mittels FcR-Block (BD, Franklin Lakes, USA) vorgenommen und eine Färbung durchgeführt mittels eines C5aR-PE-Antikörpers (Ratte-anti-Maus CD88, Klon 20/70, BioLegend, San Diego, USA) und eines dazu passenden Kontroll-IgG-Antikörpers (Ratte-Isotyp-Kontroll-IgG2b, BioLegend). Die gefärbten Proben wurden daraufhin umgehend an einem Durchflusszytometer Modell Calibur (BD, Franklin Lakes, USA) analysiert. Die spezifische Antikörperbindung wurde mittels der durchschnittlichen Fluoreszenzaktivität (mean fluorescence intensity, MFI) von 25.000 Ereignissen ausgedrückt. Die Daten wurden daraufhin mit der Software FloJo (Version 10, Tree Star, Ashland, USA) analysiert und graphisch aufbereitet.

2.6.2 Durchflusszytometrische Analyse der Modulation der C5aR-Expression von Thrombozyten nach Stimulation

PRP wurde aus menschlichem Blut gewonnen und mit PBS, oxLDL, ADP und Kollagen stimuliert, wie unter 2.2.1 und 2.2.3 beschrieben. Die Zellen wurden daraufhin nach Blockierung mittels FcR-Block (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) zum einen mit Maus-anti-Human-CD88-Antikörper (mouse anti-human CD88 Alexa Fluor 647, Klon P12/1, 5 µg/ml, BioRad, Hercules, USA) oder des

2. Material und Methoden

entsprechenden Kontroll-IgGs (Mouse IgG2a Negative Control Alexa Fluor 647, BioRad) gefärbt. Zum anderen wurde die Aktivierung der Thrombozyten mittels P-Selektin-Expression (CD62P) untersucht. Hierzu wurden die Thrombozyten nach Stimulation mittels eines Maus-anti-Human-CD62P-PE-Antikörpers (mouse anti-human CD62P-PE, Klon CLB-Thromb/6, 200 µg/ml, Beckman Coulter, Krefeld) bzw. der entsprechenden Isotyp-Kontrolle (mouse IgG1-PE, 200 µg/ml, Beckman Coulter) gefärbt. Die Analyse der gefärbten Proben wurde, wie bereits unter 2.6.1 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 6: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Ratte-anti-Maus C5aR-PE-Antikörper (Klon 20/70)	BioLegend, San Diego, USA
Ratte-Isotyp-Kontroll-IgG2b-PE	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human CD88 Alexa Fluor 647-Antikörper (Klon P12/1)	BioRad, Hercules, USA
Maus IgG2a Negative Control Alexa Fluor 647	BioRad, Hercules, USA
Maus-anti-Human-CD62P-PE-Antikörper (Klon CLB-Thromb/6)	Beckman Coulter, Krefeld
Maus-Isotyp-Kontroll-IgG1-PE	Beckman Coulter, Krefeld

2.7 Isolation von primären Endothelzellen (MLECs)

Für die Zellkulturexperimente wurden neben einer endothelialen Zelllinie (MHEC5-T) auch primäre Endothelzellen verwendet. Das bedeutet, dass diese Zellen nicht immortalisiert sind, sondern nach einer gewissen Zahl an Zellteilungen ihre spezifische endotheliale Charakteristik verlieren (Lim and Luscinskas, 2006). In diese Arbeit wurden murine Lungenendothelzellen verwendet. Diese wurden nach einem in der Literatur bereits veröffentlichten Protokoll isoliert (Choi

2. Material und Methoden

et al., 2008). Die Lungen wurden frisch aus schmerzfrei getöteten WT-Mäusen (C57Bl/6J) entnommen, in DMEM-Puffer (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Thermo Fisher) mit 10% fötalem Kälberserum (fetal bovine serum, FBS, Gibco, Thermo Fisher) und Penicillin-Streptomycin (P/S, Thermo Fisher) gewaschen. Daraufhin wurden die Lungen in etwa 1-2 mm³ große Stücke zerteilt. Dann wurde das zerkleinerte Gewebe mit Kollagenase Typ I (2 mg/ml, collagenase type I, Gibco, Thermo Fisher) in DMEM-Puffer mit 0,1% BSA (Thermo Fisher) bei 37°C für 3-4 Stunden auf einem Wippschüttler verdaut und durch ein 70 µm Zellsieb (Thermo Fisher) gegeben. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert und in DMEM-F12-Puffer (Gibco, Thermo Fisher) mit 20% FBS, P/S und 100 µg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS, Corning) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in T25-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nürnberg) ausgesät. Diese waren zuvor mit 0,4% Gelatine (Sigma-Aldrich) beschichtet worden. Das bedeutet, der Boden der Zellkulturflaschen wurde mit 0,4% Gelatinesuspension (Sigma-Aldrich) bedeckt; diese haben wir dann für 30 Minuten bei 37°C gelieren und präzipitieren lassen. Dann wurde die überstehende Flüssigkeit abgenommen. Der Boden der Zellkulturflasche war nun beschichtet. Die Zellsuspension wurde in die Flaschen gegeben; bei 37°C haben wir sie im Zellkulturschrank wachsen lassen. Nach etwa 14 Stunden wurde der Flaschenboden mit warmem PBS gewaschen, um lose und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Dann wurde neues Medium mit ECGS-Zusatz hinzugefügt. Wir haben die Zellen so lange wachsen lassen, bis sie einen subkonfluenten Zellrasen bildeten, wobei das Medium mit den bereits beschriebenen Zusätzen täglich gewechselt wurde.

Magnetische Beads sind magnetische Metallpartikel, welche mit biologischen Molekülen verbunden sind, welche sich mit spezifischen Antikörpern koppeln lassen. So können sie durch magnetische Anziehung Zellen binden, welche diese spezifischen Oberflächenstrukturen aufweisen. Dieses Prinzip wurde hier angewandt. Magnetische Anti-Ratte-Beads (Dynabeads, Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden mit Ratte-anti-Maus-CD102-Antikörpern (rat anti-mouse CD102 antibodies, ICAM-2, Klon 3C4, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) in PBS mit 0,1% BSA und 2mM EDTA (Roth, Karlsruhe) präinkubiert. Nach zwei Waschschr

2. Material und Methoden

mit DMEM-Puffer mit 0,1% BSA, wurden die Beads zu den Zellen in die Zellkulturflaschen gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Die Flaschen wurden dann vorsichtig mit warmem PBS gewaschen, um ungebundene Beads zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mittels Trypsin (Trypsin-EDTA 0,05%, Gibco, Thermo Fisher) abgelöst. Danach wurden die Zellen in Suspension anhand ihrer Bindung an die CD102-Beads aufgetrennt, indem viermal mit DMEM-Puffer mit 0,1% BSA auf einem Magneten gewaschen wurde, sodass nicht an die magnetischen Beads gebundene Zellen abgewaschen wurden. Die verbliebenen Zellen wurden in neue mit Gelatine beschichtete T25-Flaschen ausgesät; wir haben sie erneut bis zur Subkonfluenz wachsen lassen. Dann folgte ein zweiter Aufreinigungsschritt mit magnetischen Beads. Nach erneutem Aussähen haben wir die Zellen erneut bis zur Subkonfluenz wachsen lassen. Dann wurde die Reinheit der nun gewonnenen Endothelzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurde die Expression von CD102, CD31 und CD144 untersucht. Zellen, welche die Expression all dieser Marker aufwiesen, wurden als Endothelzellen definiert. Die so bestimmte Zellreinheit betrug bei den Zellen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, über 95 Prozent.

2.8 In vitro Endothelzell-Assays

Wir bereits in der Einleitung (1.2) beschrieben, sind Endothelzellen die Schlüsselzellen der Angiogenese. Ihre Proliferation, ihre Migration und ihre Fähigkeit, Röhrenstrukturen zu bilden, sind entscheidend für das Aussprossen neuer Gefäße aus bestehenden Gefäßnetzwerken, der Angiogenese. Dieser Prozess ist in vivo sehr komplex und auf vielfältige Weise moduliert und gesteuert. In vitro kann diese Komplexität nicht simuliert werden. Es lassen sich dafür aber einzelne Schritte gezielt nachstellen und spezifische Einflussfaktoren auf die beschriebenen endothelialen Funktionen untersuchen. Es ist daher von großer Bedeutung in der Angiogeneseforschung, auch in vitro spezifische Endothelzellfunktionen zu untersuchen (Cao et al., 2011).

2. Material und Methoden

2.8.1 Kultur von Endothelzellen in vitro

Alle Experimente mit primären murinen Lungenendothelzellen (MLECs) wurden innerhalb von 2 Wochen nach Isolation und Aufreinigung der Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in DMEM-Puffer (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Thermo Fisher) mit Zusatz von 10% FBS und P/S (Gibco, Thermo Fisher) sowie ECGS (endothelial cell growth supplement, Corning) auf mit 0,4% Gelatine beschichteten T75-Platten bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Alle zwei Tage wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und mit einer Zellzahl von 1.000.000 Zellen pro T75-Flasche wieder ausgesät. Für Versuche wurden die Platten mit warmem PBS gewaschen und die Zellen dann mit Trypsin abgelöst. Die Konzentration der Zellsuspension wurde mittels einer Neubauer-Kammer (C-Chip, Neubauer improved counting chamber, Roth) ausgezählt und berechnet. Um tote Zellen auszuschließen, wurde vorher eine Färbung der zu zählenden Probe mit Trypanblau durchgeführt (Trypan Blue solution 0,4%, Sigma-Aldrich).

Auch Endothelzellen der endothelialen Zelllinie MHEC5-T wurde für Endothelzellversuche in dieser Arbeit verwendet. Diese Zellen wurden bereits in der Literatur als geeignetes Endothelzellmodell beschrieben (Schönberger et al., 2014). Auch diese wurden in DMEM-Puffer (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Thermo Fisher) mit Zusatz von 5% FBS und P/S (Gibco, Thermo Fisher), und ohne ECGS kultiviert. Hierfür wurden die T75- Kulturflaschen mit 0,2% Gelatine beschichtet. Ansonsten entspricht das Handling der Zellen dem bereits für MLECs beschriebenen.

2.8.2 Proliferation-Assay in vitro

MHEC5-T-Endothelzellen wurden auf unbeschichtete 96-Well-Platten (Eppendorf, Hamburg) in einer Konzentration von 5×10^3 Zellen pro Well in oben beschriebenem Medium ausgesät. MLECs wurden in einer Konzentration von 3×10^3 Zellen pro Well verwendet. Nach 6, 18 oder 25 Stunden wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, mit Trypan gefärbt, und die Konzentration an lebenden Zellen mittels einer Neubauer-Kammer gezählt und auf die Gesamtmenge hochgerechnet.

2. Material und Methoden

2.8.3 Migration-Assay in vitro

Der sogenannte Scratch-Assay erlaubt es, das Migrationsverhalten von Endothelzellen zu untersuchen. Dieser Versuch wurde durchgeführt, wie bereits in der Literatur beschrieben (Langer et al., 2006). Hierfür wurden MHE5-T-Zellen in oder MLECs auf mit 0,2% bzw. 0,4% Gelatine beschichteten 24-Well Platten (Eppendorf, Hamburg) in einer Zahl von 2×10^3 Zellen pro Well bzw. 1×10^3 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde überprüft, ob ein subkonfluenten Zellrasen gewachsen war. War dies der Fall, so wurde dieser Zellrasen mittels einer sterilen Pipettenspitze „verwundet“. Das bedeutet, es wurde zentral in jedem Well ein etwa 1 mm breiter Streifen des Zellrasens abgekratzt. Dann wurde mit warmem PBS vorsichtig gewaschen und neues Medium hinzugefügt. Diesem wurde dann je nach Experiment eine Reihe von frisch isolierten Thrombozyten oder auch Thrombozytenüberstand hinzugefügt. Nach 16,5 Stunden für MHEC5-T oder 28 Stunden für MLECs wurden mittels eines Phasenkontrast-Mikroskops (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena) Aufnahmen des Zellrasens bei 5x-Vergrößerung gemacht. Als Maß der endothelialen Migration wurde die nach 16 bzw. 28 Stunden überwachsene Fläche mittels der Zeiss-Software Axiovision (rel. 4.8, Carl Zeiss, Jena) quantifiziert.

2.8.4 Tube formation-Assay in vitro

Endothelzellen haben die Eigenschaft, spontan röhrenartige Strukturen zu bilden, wenn sie in oder auf einer geeigneten Matrix ausplattiert werden. Diese Eigenschaft zeichnet Endothelzellen aus und definiert diesen Zelltyp in vitro (Folkmann and Haudenschild, 1980). Bezeichnet wird diese Fähigkeit als Tube formation. In einem in vitro Versuch, dem sogenannten Tube formation-Assay, lässt sich diese Eigenschaft von Endothelzellen als ein in vitro Angiogenesemodell nutzen.

48-Well-Platten (Eppendorf) wurden mit Matrigel (Corning Inc, Corning, USA) beschichtet. Bei 3°C ist Matrigel flüssig und wurde blasenfrei in die Wells pipetiert. Das Matrigel geliert durch Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Jeweils 3×10^4 Zellen der MHEC5-T-Linie oder MLECs wurden auf das vorbereitete Matrigel

2. Material und Methoden

ausgesät. Als Medium wurde endotheliales Kulturmedium mit nur 1% FBS verwendet. Nach 30 Minuten hatten sich die Zellen abgesetzt. Es wurden Phasenkontrast-Aufnahmen bei 5x-Vergrößerung gemacht. Anhand dieser Aufnahmen wurde die gleichmäßige Verteilung der Zellen überprüft. Ergaben sich hierbei Abweichungen, wurde dieses Well aus der Analyse ausgeschlossen. Es erfolgte nun die Koinkubation mit frisch isolierten Thrombozyten (2×10^6 / Well) oder dem Überstand von Thrombozyten, wobei dieser im Verhältnis 1:1 mit Endothelzellmedium gemischt wurde. Die FBS-Konzentration wurde allerdings stabil bei 1% gehalten. Als Kontrollbedingungen wurde eine Koinkubation mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 durchgeführt. Nach 6,5 Stunden für MHEC5-T und nach 10 Stunden bei MLECs wurden Aufnahmen von Wells mittels eines Phasenkontrast-Mikroskops (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena) bei 10x-Vergrößerung gemacht. Es wurden jeweils 2 Aufnahmen von repräsentativen Ausschnitten jedes Wells angefertigt. Als Maß der tube formation wurden die Längen aller tubes pro Well mittels der Zeiss-Software Axiovision manuell ausgemessen und addiert.

2.9 ELISA-Analyse von Thrombozytenüberstand

Der Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren, mit dem niedermolekulare Verbindungen oder Proteine qualitativ bzw. quantitativ nachgewiesen werden können. Primärantikörper sind auf einer Platte hierbei in einer festen Phase aufgetragen (capture-Antikörper). Darauf wird eine Lösung mit der zu messenden Substanz gegeben, sodass das Antigen von Interesse an den Primärantikörper binden kann. Durch mehrere Waschschrte werden alle anderen Antigene entfernt, außer der der zu messenden Substanz. Nun wird ein zweites Reagens mit einem Detektor in die Wells gefüllt, welches mittels eines weiteren Antikörpers, des detection-Antikörpers, das zu messende Antigen erkennt. Nach einer weiteren Inkubationszeit wird erneut gewaschen und ungebundene Antikörper entfernt. Jetzt befindet sich in jedem Well eine zur Menge des Antigens proportionale Menge detection-Antikörper. Dieser ist meist mit Meerrettich-Peroxidase markiert. Durch Zugabe eines Substrats, das durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion in ein intensiv farbiges Produkt umgesetzt

2. Material und Methoden

wird, erreicht man eine der Enzymmenge und somit auch der Antigenmenge proportionale Änderung der Lichtabsorption in den einzelnen Wells, welche mit Hilfe eines Photometers gemessen werden kann. Mit Hilfe einer Standardverdünungsreihe des zu untersuchenden Antigens kann durch Interpolation auf die Antigenkonzentration in der Probe rückgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde der Überstand von Thrombozyten, welche mit C5a stimuliert wurden, mittels ELISA untersucht. Die Gewinnung des Überstands wurde unter 2.2.4 beschrieben. Es wurde zum einen ein Proteome Profiler Mouse Angiogenesis Array Kit (ARY015, R&D Minneapolis, USA) verwendet. Hierbei sind die capture-Antikörper auf einer Membran aufgetragen. Die detection-Antikörper werden mit der Probe vermischt und inkubiert, dann erfolgt die Inkubation der Membran mit dem Antigen-Antikörper-Mix. Dieser Assay erlaubt die relative Quantifizierung von 53 Angiogenese-assoziierten Proteinen parallel. Dieser Versuch wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zum Zweiten wurde mittels eines konventionellen ELISAs das antiangiogene Peptid platelet factor 4 (PF4, CXCL4) gemessen und deren Konzentration im Überstand von mit C5a stimulierten Thrombozyten bestimmt. Hierfür wurde das Mouse CXCL4/PF4 Quantikine ELISA Kit (R&D) verwendet. Dieser Versuch wurde ebenfalls gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung des ELISAs erfolgte an einem Microplate Reader 550 ELISA-Lesegerät (BioRad, Hercules, USA).

2.10 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mittels ungepaartem, zweiseitigem Student t-Test oder Varianzanalyse auf ihre statistische Aussagekraft hin untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 ERGEBNISSE

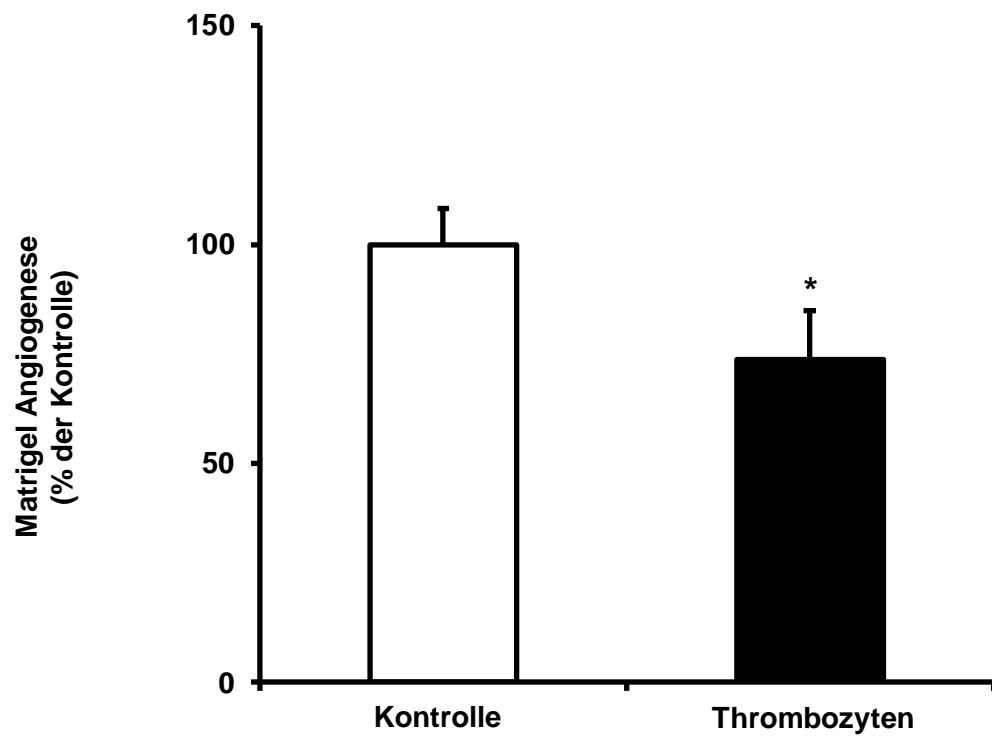
3.1 Thrombozyten inhibieren wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese in vivo

Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, dass Thrombozyten die Angiogenese beeinflussen (Italiano et al., 2008). Die Relevanz dieser Erkenntnisse für die Modulation der Angiogenese in vivo ist allerdings bisher unzureichend untersucht. Im Matrigelplug-Assay wird eine solubilisierete Matrix in Mäuse subkutan injiziert und härtet dort aus. Dieser Plug wird in der Folge vaskularisiert, d.h. es wachsen Blutgefäße ein (s. 2.3). Dieses Einwachsen von Blutgefäßen lässt sich deutlich verstärken, indem der Matrix ein endothelialer Wachstumsfaktor (s. Einleitung 1.2.1) zugesetzt wird. Um die Rolle von Thrombozyten in der wachstumsfaktorinduzierten Angiogenese zu untersuchen, haben wir diese in Matrigel gemischt und dieses dann injiziert. Zuvor hatten wir überprüft, ob Thrombozyten nach Suspension in kaltem Matrigel weiterhin funktionell bleiben. Thrombozyten, welche in kaltes Matrigel injiziert wurden und dann aus dem ausgehärteten Plug in vitro isoliert wurden, ließen sich weiterhin mit ADP stimulieren. Dies haben wir anhand der Hochregulation des Aktivierungsmarkers P-Selektin mittels Durchflusszytometrie untersucht

Mischt man Thrombozyten in Matrigel, so resultiert hieraus eine signifikante Abnahme an Zellkernflächenanteil im Matrigelquerschnitt 7 Tage nach subkutaner Injektion des Matrigels in vivo (Abb. 8). Thrombozyten scheinen also wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese zu inhibieren. Als Kontrollbedingung wurde statt Thrombozytensuspension das gleiche Volumen Tyrodes-Puffer pH 7,4 mit Matrigel vermischt und injiziert.

3. Ergebnisse

A



B

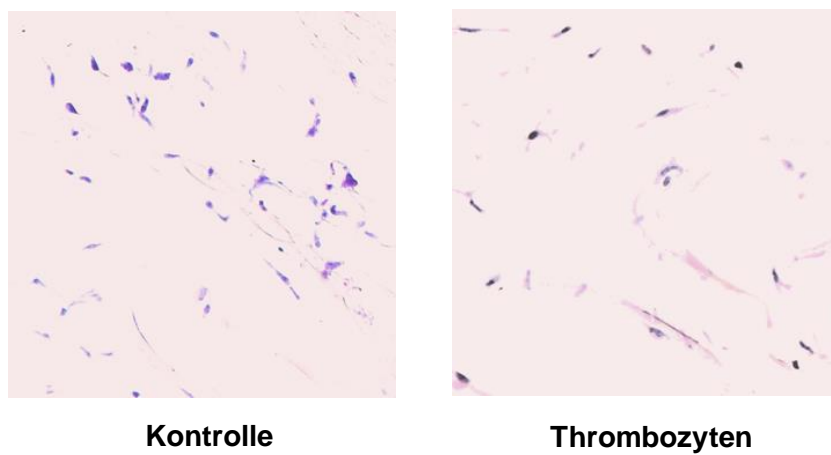


Abb. 8: **Zugabe von Thrombozyten und bFGF ins Matrigel inhibiert die Endothelzellkernfläche pro Matrigelquerschnitt in vivo**

3. Ergebnisse

- A WT-Mäuse wurden dem Matrigel-Assay zugeführt. Matrigelplugs mit Zusatz von 100.000.000 frisch isolierter muriner Thrombozyten pro Plug oder Puffer als Kontrolle wurden durch subkutane Injektion erzeugt. Das Matrigel wurde zusätzlich mit bFGF angereichert. Die Plugs wurden nach 7 Tagen entnommen und histologisch analysiert. Angiogenese wurde als Zellkernfläche pro Matrigelquerschnitt quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 6-7 Matrigelplugs pro Gruppe) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert den Zellkernflächenanteil von Matrigelplugs mit Zusatz von bFGF und Puffer. * steht für $p < 0,05$.*
- B Repräsentative histologische Bilder von Matrigelschnitten, die mit H&E gefärbt wurden. Es zeigt sich, dass die Zugabe von Thrombozyten die Zahl der Zellkerne pro Matrigelschnitt reduziert.*

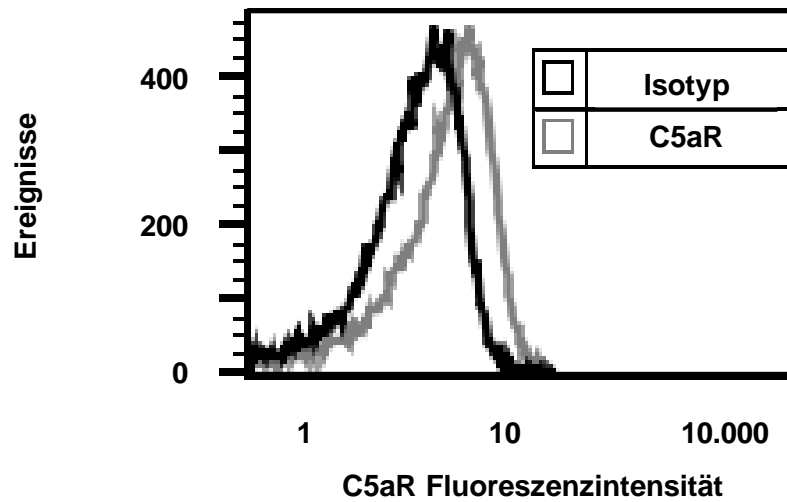
3.2 Thrombozyten exprimieren den C5a-Rezeptor im angiogen aktiven Gewebe in vivo

Auf der Oberfläche von Thrombozyten sind eine große Zahl verschiedener Rezeptoren exprimiert. Interessanterweise exprimieren Thrombozyten auch den Komplementrezeptor C5aR (Patzelt et al., 2015a; Martel et al., 2011). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression dieses Rezeptors auf frisch isolierten murinen gewaschenen Thrombozyten untersucht (Abb. 9 A). Als Kontrolle diente ein Isotyp-Antikörper. Es zeigte sich eine signifikante Bindung des spezifischen Antikörpers gegen C5a-Rezeptor gegenüber dem Isotyp-Antikörper. Somit ist von einer Expression des Rezeptors auf Thrombozyten auszugehen.

Im Hindlimb-ischemia-Assay wird mittels Ligatur der Femoralarterie Ischämie in der abhängigen Extremität der Maus erzeugt (s. 2.4). Hierdurch wird Angiogenese induziert (s. 1.2.1). Nach 14 Tagen wurden die Gastrocnemius-Muskeln der operierten ischämischen Extremität explantiert und histologisch aufgearbeitet. Hierbei ließ sich mittels Immunfluoreszenzfärbung nachweisen, dass Thrombozyten, welche sich in der Färbung CD41-positiv aber negativ für den Zellkernmarker DAPI darstellen, im ischämischen Muskelgewebe vorkommen und ihr Fluoreszenzsignal mit dem von C5aR kolokalisiert (Abb. 9 B). Thrombozyten exprimieren also den C5a-Rezeptor im angiogen aktiven Gewebe.

3. Ergebnisse

A



B

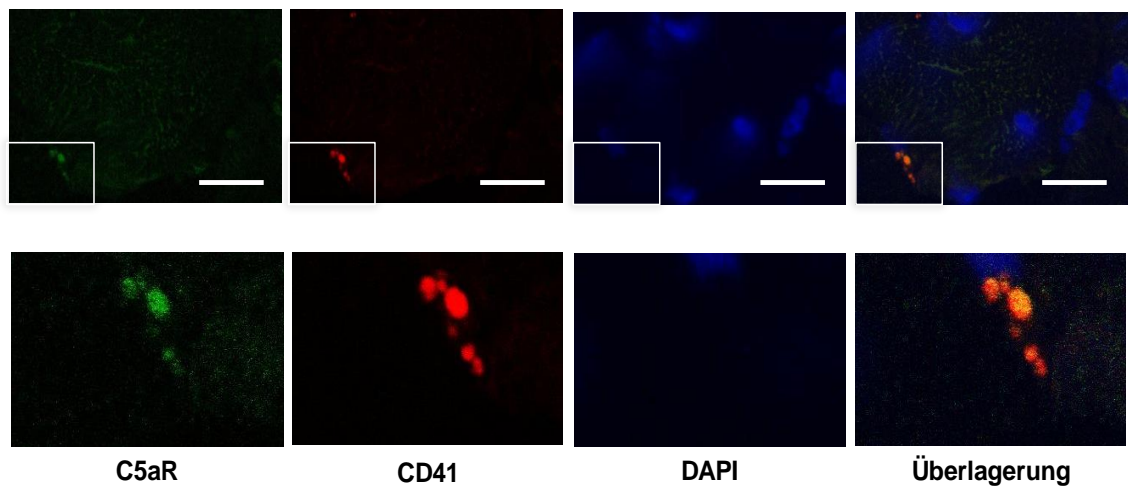


Abb. 9: Thrombozyten exprimieren den C5a-Komplementrezeptor, auch im angiogen aktiven ischämischen Muskelgewebe

A Frisch isolierte, murine, gewaschene Thrombozyten wurden durchflusszytometrisch auf C5aR-Expression untersucht. Dargestellt ist das Fluoreszenzintensitäts-histogramm nach spezifischer C5aR-Antikörper-Färbung versus Isotyp-Kontrollfärbung.

3. Ergebnisse

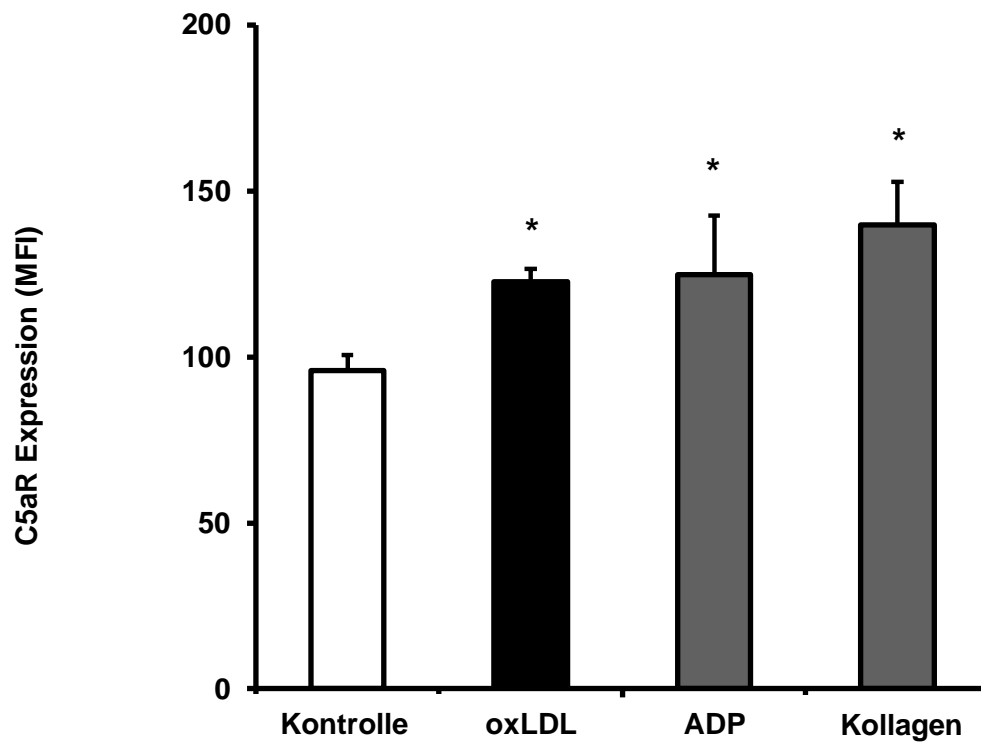
B Ischämische Hinterlauf-Muskeln von WT-Mäusen wurden 14 Tage nach Induktion der Ischämie entnommen und histologisch analysiert. In der Immunfluoreszenzfärbung ist die DAPI-Zellkernfärbung in blau dargestellt, C5aR in grün und thrombozytenspezifisches CD41 in rot. Die Kolokalisation von C5aR und CD41 auf DAPI-negativen zellkernlosen Thrombozyten stellt sich orange dar, wie in der Ausschnittsvergrößerung des unteren linken Bildabschnitts im oberen Ausschnitt zu erkennen ist. Die Vergrößerung beträgt 63x. Die Maßstabsbalken markieren 5 μ m.

3.3 Thrombozyten modulieren die Expression des C5a-Rezeptors in vitro

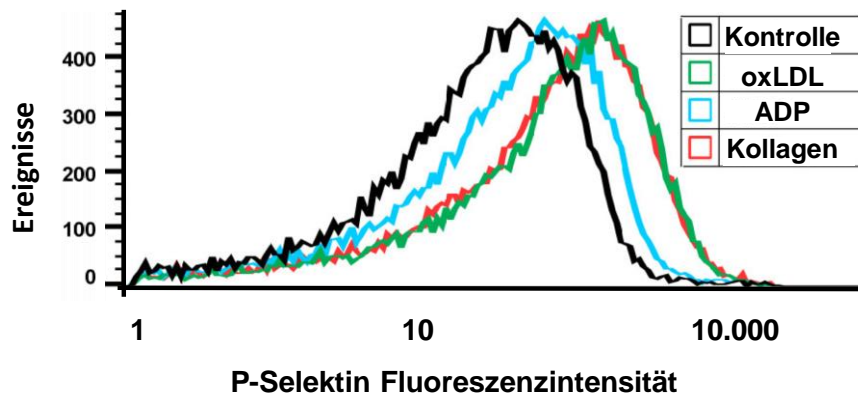
Wie in der Einleitung unter 1.4.1 ausgeführt, besteht die Hauptfunktion der Thrombozyten in der primären Hämostase. Bei diesem Prozess stellt die Aktivierung von Thrombozyten einen fundamentalen Mechanismus dar (Hagedorn et al., 2010). Um die Bedeutung des C5a-Komplementrezeptors auf Thrombozyten für deren Funktion zu beleuchten, haben wir daher untersucht, inwiefern die Expression des C5aR durch die Aktivierung von Thrombozyten mittels klassischer Aktivatoren beeinflusst wird. Hierzu haben wir menschliche Thrombozyten freiwilliger Spender in PRP isoliert und diese daraufhin mit oxLDL, ADP oder Kollagen stimuliert. Die Expression des C5aR wurde daraufhin mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es zeigte sich, dass oxLDL und Kollagen zu einer signifikanten Hochregulation von C5aR gegenüber einer Kontroll-Stimulation mit PBS führen, während dieser Effekt für die ADP-Stimulation nicht signifikant war (Abb. 10 A und B). Zum Nachweis einer erfolgreichen Plättchenaktivierung durch die verwendeten Stimulationen wurde ebenfalls die P-Selektin-Expression nach Stimulation nachgewiesen (Abb. 10 C). Für alle verwendeten Substanzen zeigte sich eine signifikante P-Selektin-Hochregulierung nach Stimulation.

3. Ergebnisse

A



B



3. Ergebnisse

C

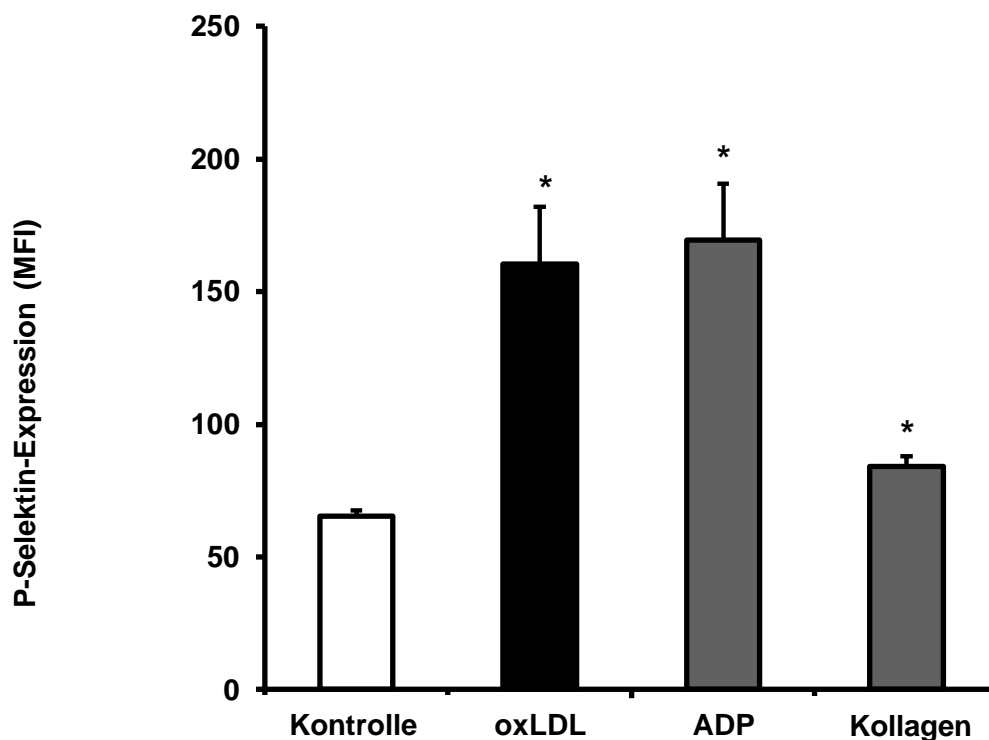


Abb. 10: **Bei Aktivierung von Thrombozyten wird die C5aR-Expression hochreguliert**

- A Humane Thrombozyten, welche als PRP isoliert wurden, wurden mit oxLDL, ADP und Kollagen für 30 min bei 37°C stimuliert. Daraufhin wurde die C5aR-Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte der MFI von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 3 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Kontroll-Stimulation mit PBS. * steht für p<0,05.
- B Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Fluoreszenzintensitätshistogramm, welches die Fluoreszenzintensitätskurven nach Stimulation mit Kontrollmedium, oxLDL, ADP und Kollagen darstellt
- C Die Aktivierung von Thrombozyten mittels der verwendeten Stimulantien ist erfolgreich. Nach Stimulation mit oxLDL, ADP und Kollagen lässt sich auf der Oberfläche von Thrombozyten eine signifikante Zunahme der P-Selektin-Expression mittels Durchflusszytometrie feststellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 3 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Kontroll-Stimulation mit PBS. * steht für p<0,05.

3. Ergebnisse

3.4 Einfluss des thrombozytären C5a-Rezeptors auf die Proliferation von Endothelzellen in vitro

Sowohl das Komplementsystem als auch Thrombozyten spielen in der Angiogenese eine Rolle (Brill et al., 2004; Langer et al., 2010). Zusätzlich exprimieren Thrombozyten den C5a-Rezeptor im angiogen aktiven Gewebe (Abb. 9) und die Expression des Rezeptors scheint durch Thrombozyten aktivierungsabhängig reguliert zu werden (Abb. 10). Es stellt sich daher die Frage, ob Thrombozyten auch an der Modulation der Angiogenese Anteil haben. Wie unter Abschnitt 1.2 beschrieben, spielt bei der Angiogenese die Proliferation von Endothelzellen, aber auch deren Migration und die Bildung primitiver Röhrenstrukturen, sogenannter „tubes“, eine entscheidende Rolle. Diese Schritte lassen sich in vitro mittels kultivierter Endothelzelllinien aber auch primärer Endothelzellen nachvollziehen. Wir haben daher frisch isolierte, gewaschene, murine Thrombozyten mit murinen Endothelzellen koinkubiert. Dabei haben wir Thrombozyten aus WT-Tieren wie auch aus C5aR-Knockout-Mäusen verwendet, welche auf ihrer Oberfläche keinen funktionellen C5a-Rezeptor aufweisen (Hopken et al., 1996). Endothelzellen der murinen, endothelialen Zelllinie MHEC5-T zeigten keine Beeinflussung ihrer Proliferation zu Zeitpunkt 6 Stunden, 18 Stunden und 25 Stunden, durch Koinkubation mit WT oder C5aR-Knockout-Thrombozyten (Abb. 11).

3. Ergebnisse

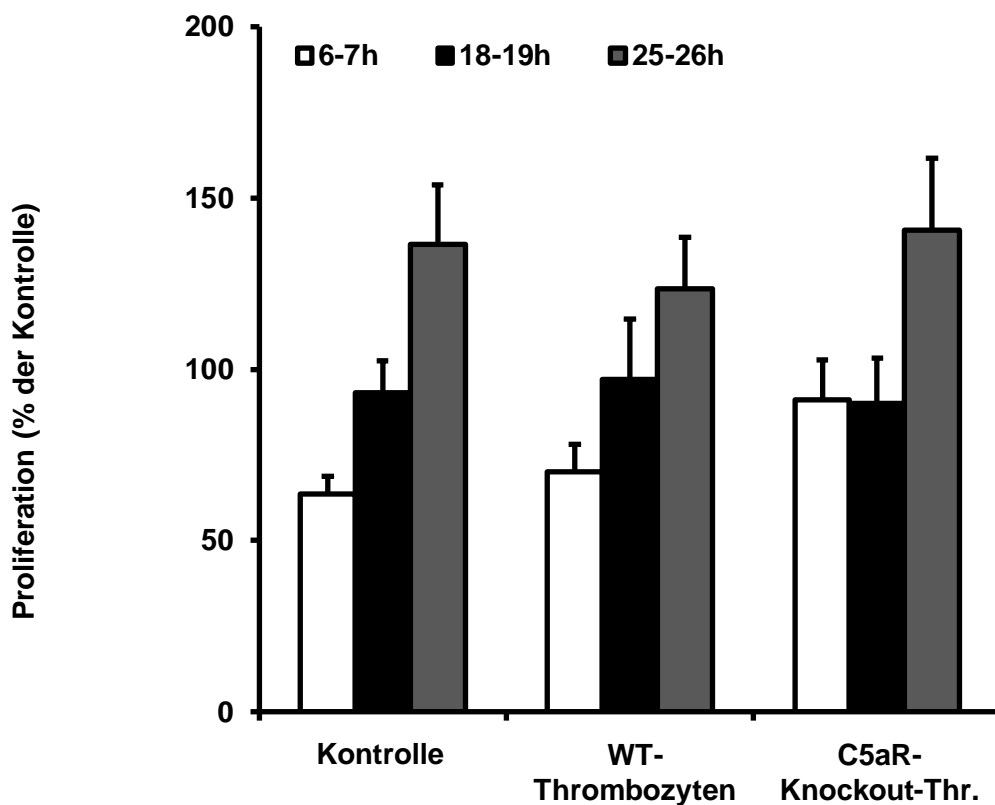


Abb. 11: **Koinkubation von WT- oder C5aR-Knockout-Thrombozyten hat keinen Effekt auf die Proliferation von MHE5-T-Endothelzellen**

Murine Endothelzellen der Zelllinie MHEC5-T wurden kultiviert, wie unter 2.8.1 beschrieben. Daraufhin wurden sie mit frisch isolierten Thrombozyten aus WT- oder C5aR-Knockout-Tieren koinkubiert. Nach 6, 18 und 25 Stunden wurden die Zellen mittels einer Neugebauer-Kammer gezählt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF ($n=5$ unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Zellzahl zum Beginn des Experiments. * steht für $p<0,05$.

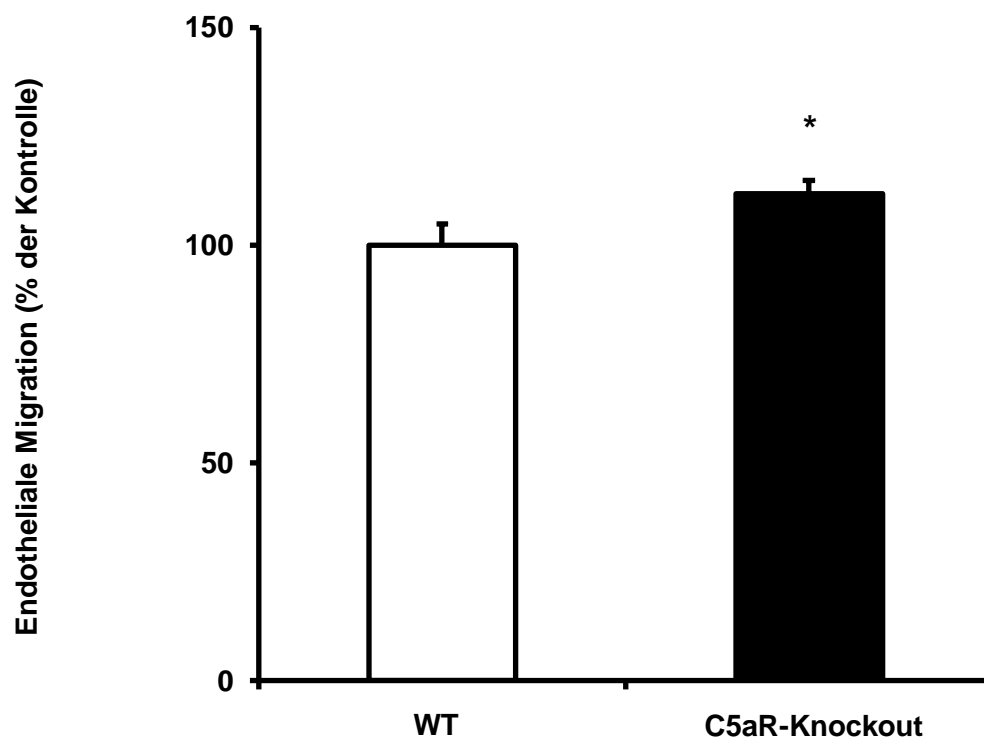
3.5 Einfluss des thrombozytären C5a-Rezeptors auf die Migration von Endothelzellen in vitro

Die Migration von Endothelzellen ist entscheidend für das Aussprossen neuer Blutgefäße aus einem bereits existierenden Gefäßnetzwerk (Lammert and Axnick, 2012). Diese Migrationsfähigkeit von Endothelzellen lässt sich ebenfalls in vitro untersuchen. Endothelzellen werden bis zur Subkonfluenz wachsen gelassen. Daraufhin wird in der Mitte ein Streifen abgekratzt, welcher daraufhin vom Rand her wieder zuwächst oder „heilt“. Primäre, murine Lungenendothelzellen

3. Ergebnisse

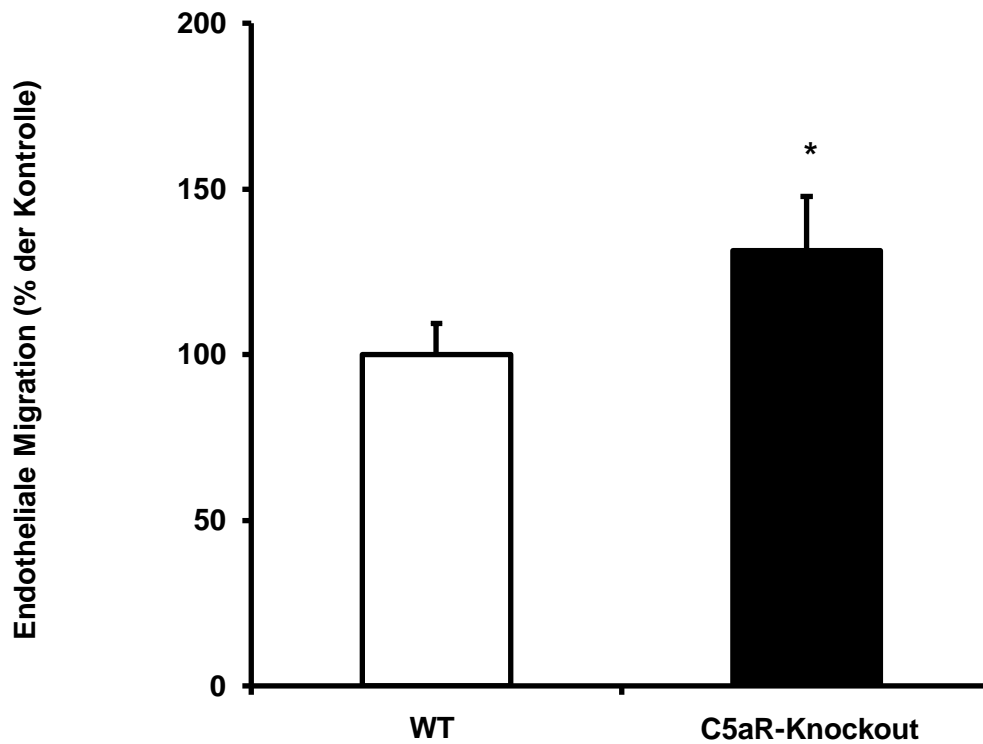
zeigten nach Koinkubation mit C5aR-Knockout-Thrombozyten eine verstärkte Migration gegenüber der Koinkubation mit WT-Thrombozyten (Abb. 12). Die Reinheit der verwendeten primären Endothelzellen betrug über 90%. Dies wurde mittels Färbung auf die Oberflächenmarker CD31, CD102 und CD144 in der Durchflusszytometrie getestet. Zellen mit allen drei Markern wurden als Endothelzellen definiert.

A



3. Ergebnisse

B



C

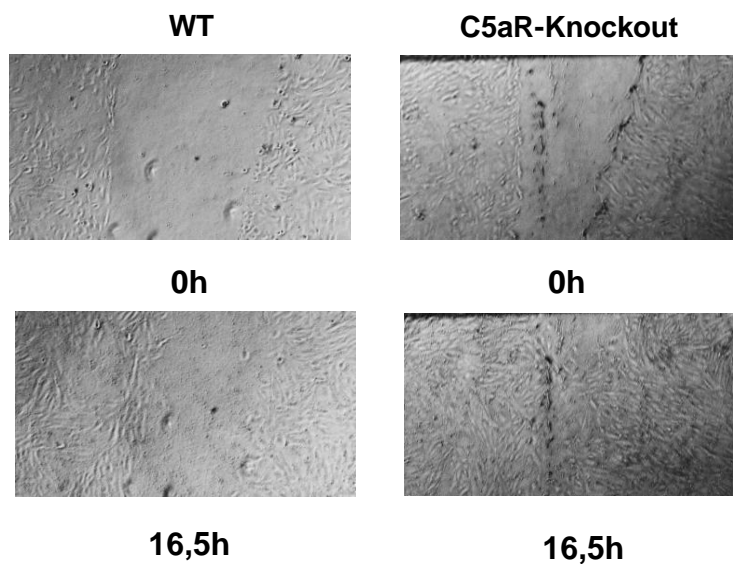


Abb. 12: *Koinkubation von C5aR-Knockout-Thrombozyten versus WT-Thrombozyten mit primären, murinen Lungen-Endothelzellen oder MHEC5-T Endothelzellen führt zu einer gesteigerten endothelialen Migration*

3. Ergebnisse

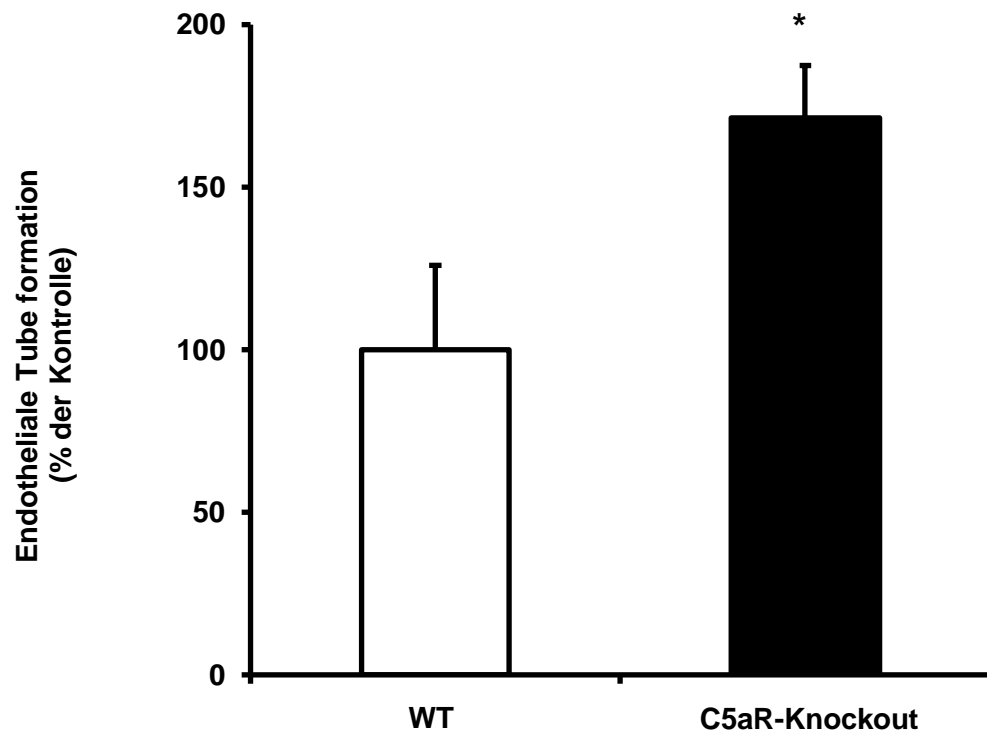
- A Murine Endothelzellen der Zelllinie MHEC5-T wurden kultiviert, wie unter 2.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz wachsen gelassen. Daraufhin wurde mit einer Pipettenspitze ein Streifen des Zellrasens abgekratzt. Der Zellrasen wurde dann mit frisch isolierten, gewaschenen Thrombozyten aus WT- oder C5aR-Knockout-Tieren koinkubiert. Nach 16,5 Stunden wurde die überwachsene Fläche quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 6 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die überwachsene Fläche in der Gruppe mit Koinkubation mit WT-Thrombozyten. * steht für $p < 0,05$.*
- B Primäre Endothelzellen isoliert aus Mäuselungen (MLEC) wurden isoliert und kultiviert, wie unter 2.7 beschrieben. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz wachsen gelassen. Daraufhin wurde mit einer Pipettenspitze ein Streifen des Zellrasens abgekratzt. Der Zellrasen wurde dann mit frisch isolierten gewaschenen Thrombozyten aus WT- oder C5aR-Knockout-Tieren koinkubiert. Nach 28 Stunden wurde die überwachsene Fläche quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 6 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die überwachsene Fläche in der Gruppe mit Koinkubation mit WT-Thrombozyten. * steht für $p < 0,05$.*
- C Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen eines „verwundeten“ Zellrasens aus MHEC5-T-Endothelzellen. Nach Koinkubation mit C5aR-Knockout-Thrombozyten „heilt“ Zellrasen schneller als nach Koinkubation mit WT-Thrombozyten.*

3.6 Einfluss des thrombozytären C5a-Rezeptors auf die Tube formation von Endothelzellen in vitro

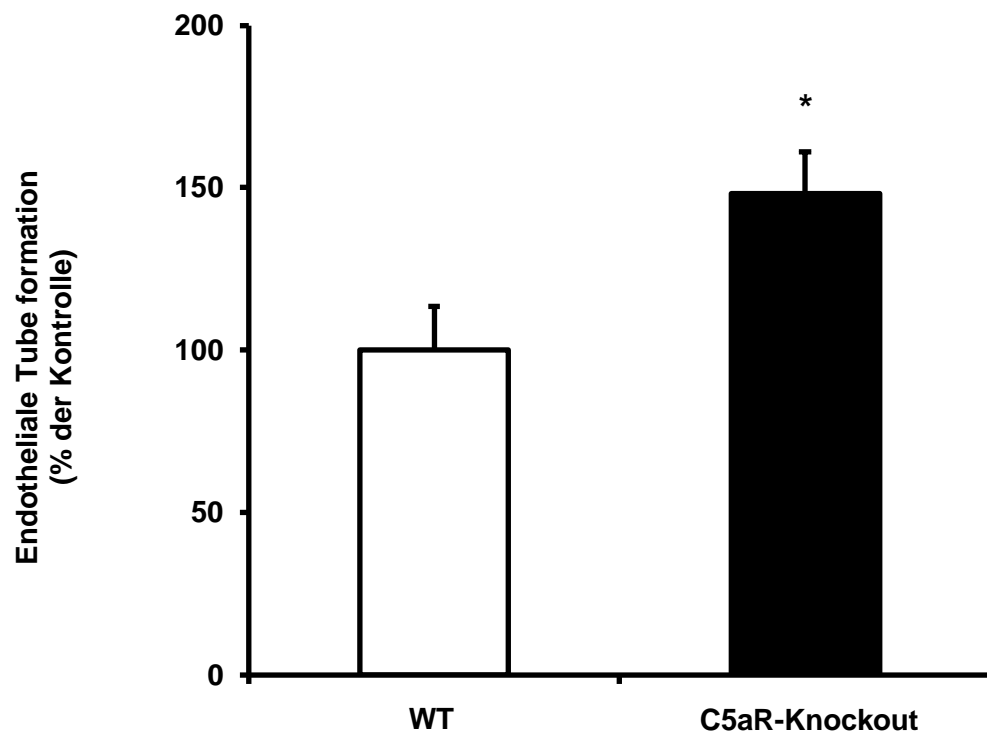
Auf einer biologischen Matrix beginnen Endothelzellen spontan damit, röhrenartige Strukturen, sogenannte tubes, zu bilden. Diese Eigenschaft definiert Endothelzellen (s. 1.2). Wir haben MHEC5-T Endothelzellen (Abb. 13 A, C) sowie primäre MLEC-Endothelzellen (Abb. 13 B) mit WT und C5aR-Knockout-Thrombozyten auf einer solchen Matrix koinkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Koinkubation mit C5aR-Knockout-Thrombozyten zu einer verstärkten Tube formation gegenüber der Koinkubation mit WT-Thrombozyten führt (Abb. 13).

3. Ergebnisse

A



B



3. Ergebnisse

C

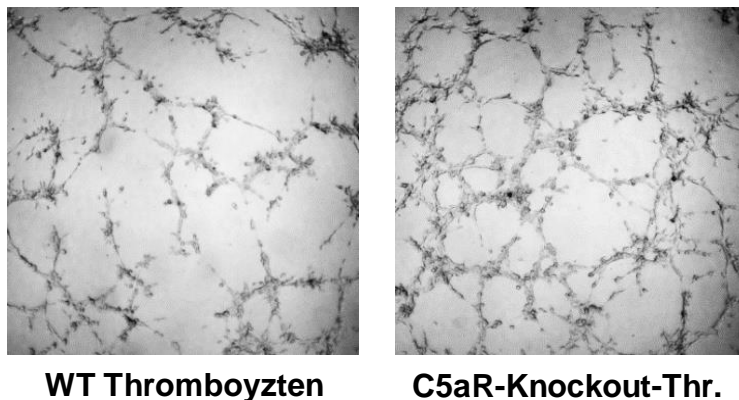


Abb. 13: Koinkubation von C5aR-Knockout-Thrombozyten versus WT-Thrombozyten mit primären murinen Lungen-Endothelzellen oder MHEC5-T Endothelzellen führt zu einer gesteigerten endothelialen Tube formation

- A** Murine Endothelzellen der Zelllinie MHEC5-T wurden kultiviert, wie unter 2.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden auf Matrigel ausgesät. Daraufhin wurden sie mit frisch isolierten gewaschenen Thrombozyten aus WT- oder C5aR-Knockout-Tieren koinkubiert. Nach 6,5 Stunden wurde die Gesamtlänge der tubes quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF ($n=4$ unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Gesamtlänge der tubes nach Koinkubation mit WT-Thrombozyten. * steht für $p<0,05$.
- B** Primäre murine Lungenendothelzellen (MLEC) wurden isoliert und kultiviert, wie unter 2.7 beschrieben. Die Zellen wurden auf Matrigel ausgesät. Daraufhin wurden sie mit frisch isolierten gewaschenen Thrombozyten aus WT- oder C5aR-Knockout-Tieren koinkubiert. Nach 10 Stunden wurde die Gesamtlänge der tubes quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF ($n=4$ unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Gesamtlänge der tubes nach Koinkubation mit WT-Thrombozyten. * steht für $p<0,05$.
- C** Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der Tube formation bei MHEC5-T Endothelzellen. Nach Koinkubation mit C5aR-Knockout-Thrombozyten ist die Tube formation verstärkt gegenüber Koinkubation mit WT-Thrombozyten.

3. Ergebnisse

3.7 C5a-Rezeptor-Knockout-Mäuse zeigen ein erhöhtes Niveau an wachstumsfaktorinduzierter Angiogenese in vivo

Mittels des Matrigelplug-Assays lässt sich wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese in vivo quantifizieren (Langer et al., 2010). Um zu untersuchen, ob der C5a-Komplementrezeptor auch in vivo eine antiangiogene Rolle einnimmt, haben wir den Matrigel-Assay bei WT- und C5aR-Knockout-Mäusen durchgeführt. Das Matrigel wurde dabei vor Injektion mit dem endothelialen Wachstumsfaktor bFGF (s. 1.2.1) angereichert, sodass hierbei wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese gemessen wurde. Hierbei zeigte sich, wie bereits bei Langer et al. 2010 beschrieben (Langer et al., 2010), dass C5aR-Knockout-Mäuse ein erhöhtes Angiogeneseniveau im Matrigel-Assay aufweisen (Abb. 14).

A

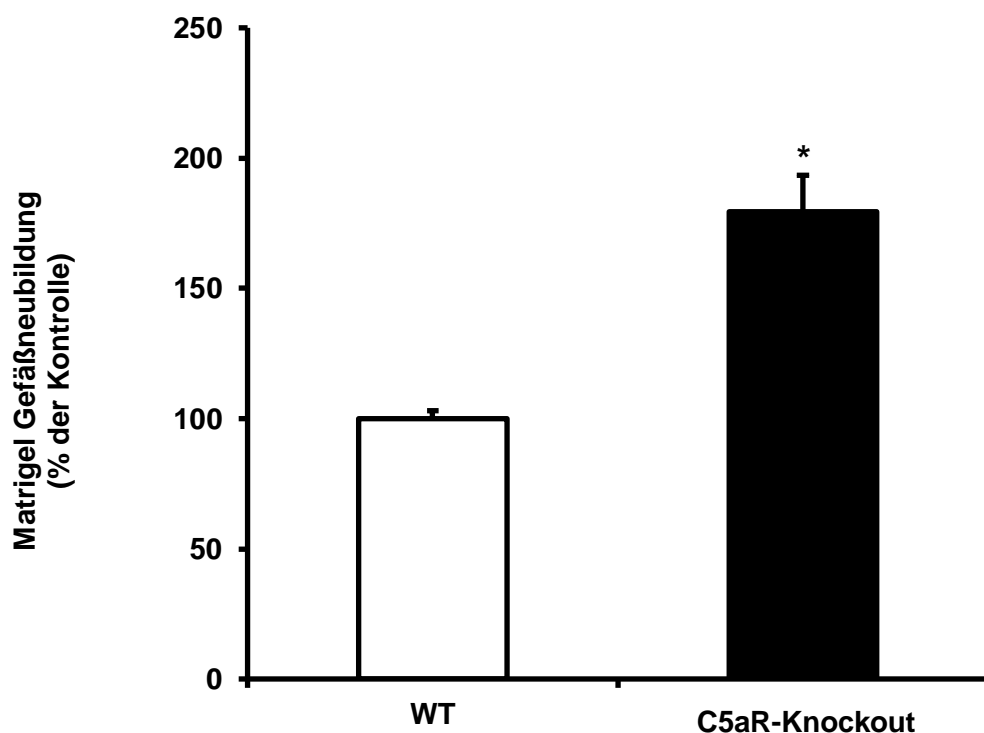


Abb. 14: Wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese im Matrigelplug-Assay ist bei C5aR-Knockout-Mäusen verstärkt gegenüber WT-Tieren

3. Ergebnisse

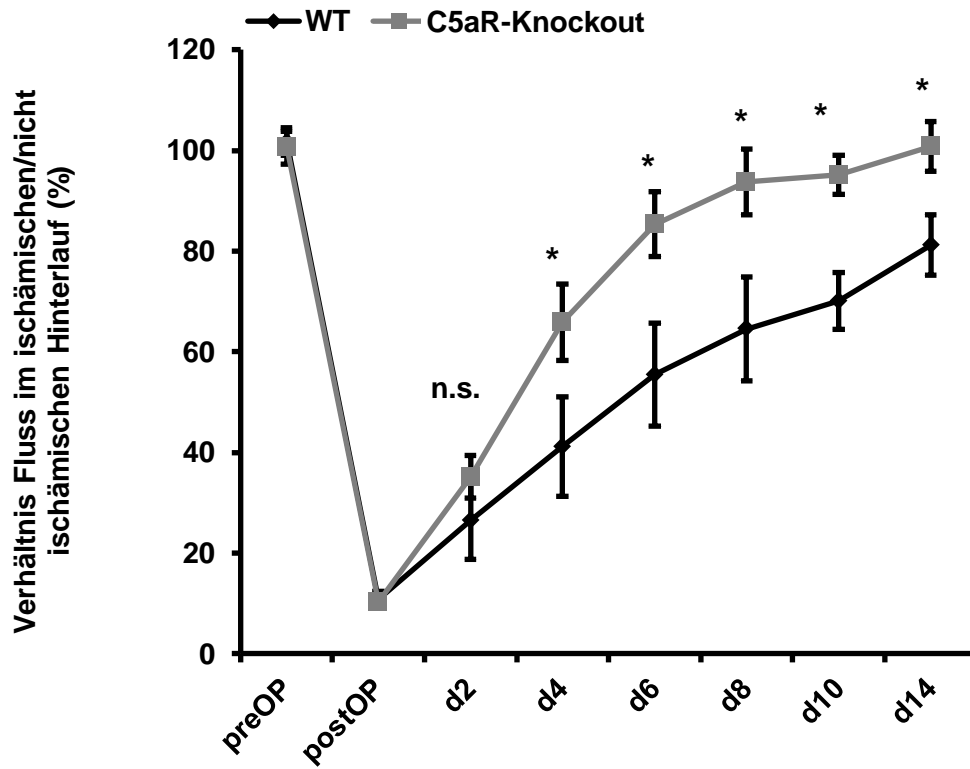
*A Matrigel wurde mit dem endothelialen Wachstumsfaktor bFGF angereichert und subkutan in WT- oder C5aR-Knockout-Mäuse injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Matrigelplugs explantiert und die Gefäßneubildung darin histologisch als Fläche der Zellkerne pro Matrigelplugquerschnitt quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF ($n= 6-8$ unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Fläche der Zellkerne pro Matrigelplug in WT-Tieren. * steht für $p<0,05$.*

3.8 C5a-Rezeptor-Knockout-Mäuse zeigen ein erhöhtes Niveau an hypoxiegetriggelter Angiogenese in vivo

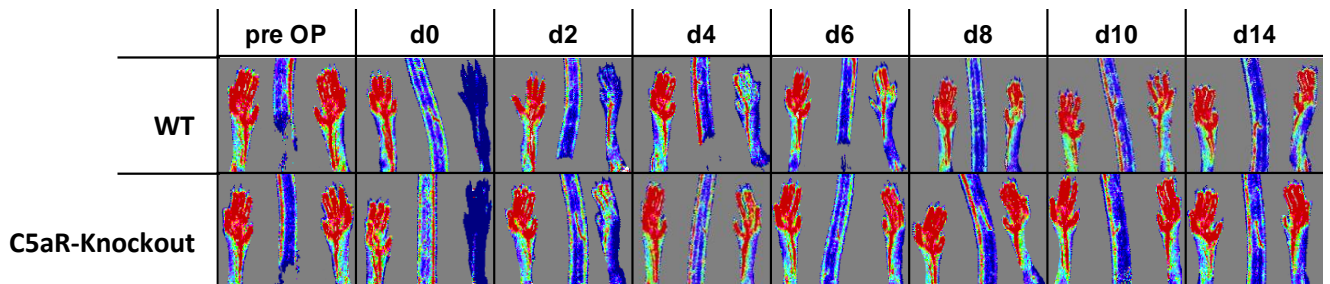
Als nächstes wurde untersucht, ob der C5a-Komplementrezeptor auch in einem Modell hypoxiegetriggelter Angiogenese antiangiogen wirksam ist. Hierzu wurde der Hindlimb-ischemia-Assay durchgeführt. Hierbei wird die Femoralarterie der Maus einseitig ligiert. So entsteht Hypoxie in der abhängigen Extremität, welche wiederum Angiogenese induziert (s. 1.2.1). Die Revaskularisation wurde mittels Laser-Doppler-Fluximetrie über einen Zeitraum von 2 Wochen regelmäßig beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass C5aR-Knockout-Tiere eine schnellere und verstärkte Revaskularisation im Vergleich zu WT-Tieren aufweisen (Abb. 15 A, B). Nach zwei Wochen wurden die Musculi gastrocnemii der hypoxischen und nicht hypoxischen Extremität der Mäuse explantiert. Mittels Immunfluoreszenzfärbung auf den Endothelzellmarker CD31 wurde die Kapillardichte in beiden Muskeln quantifiziert. C5aR-Knockout-Mäuse zeigten eine höhere Kapillardichte zwei Wochen nach Induktion der Ischämie gegenüber WT-Tieren (Abb. 15 C, D).

3. Ergebnisse

A

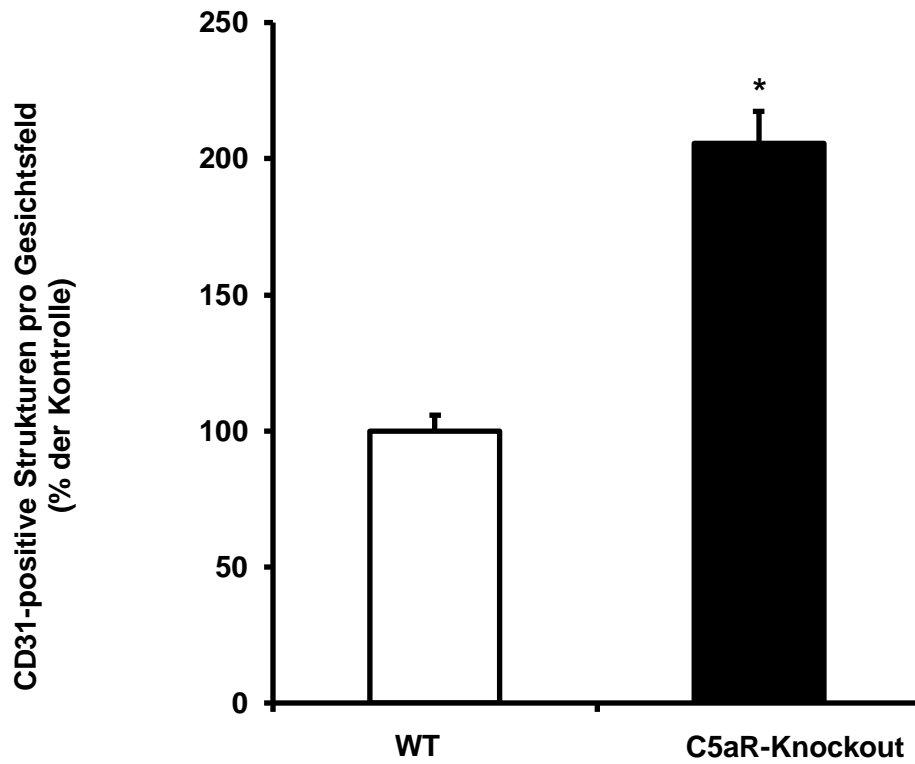


B



3. Ergebnisse

C



D

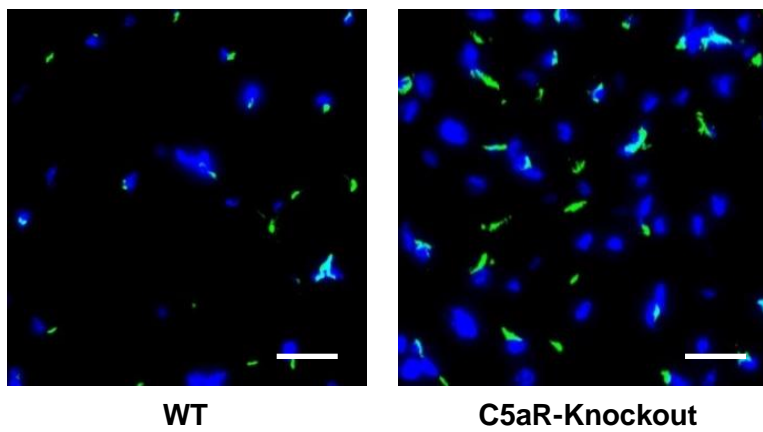


Abb. 15: *Hypoxiegetriggerte Angiogenese im Hindlimb-ischemia-Assay ist bei C5aR-Knockout-Mäusen verstärkt gegenüber WT-Tieren*

3. Ergebnisse

- A *WT- und C5aR-Knockout-Mäuse wurden der Hindlimb-ischemia-Operation unterzogen. Nach Ligation der Femoralarterie wurde die Durchblutung der unteren Extremität mittels Laser-Doppler-Fluximetrie präoperativ, postoperativ sowie an Tag 2, 4, 6, 8, 10 und 14 gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 7 operierte Tiere) der Durchblutungswerte im Verhältnis operierte zu nicht-operierte Extremität als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die mittlere Durchblutung der operierten im Verhältnis zur nicht operierten Extremität bei WT-Mäusen. * steht für $p < 0,05$. Abkürzungen: preOP = präoperativ; postOP = postoperativ; d = Tag, n.s. = nicht signifikant.*
- B *Die Abbildung zeigt repräsentative Scan-Bilder der Laser-Doppler-Fluximetrie der murinen Hinterläufe nach Hindlimb-ischemia-Operation bei WT- und C5aR-Knockout-Mäusen. Es zeigt sich, dass die Revaskularisation nach Induktion der Ischämie bei C5aR-Knockout Tieren schneller und stärker vonstattengeht als bei WT-Mäusen.*
- C *An Tag 14 nach Induktion der Ischämie im Hindlimb-ischemia-Versuch wurde die Kapillardichte in histologischen Schnitten der explantierten Gastrocnemius-Muskeln des operierten ischämischen Hinterlaufs bestimmt. Es wurden pro Muskel jeweils 10 Schnitte mit einem Mindestabstand von 200 μ m analysiert, von denen jeweils 5 Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 40x quantifiziert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 7 operierte Tiere) der Kapillanzahl pro Gesichtsfeld als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Kapillardichte von Gastrocnemius-Muskeln der operierten Hinterläufe bei WT-Mäusen. * steht für $p < 0,001$.*
- D *Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen von Hindlimb-ischemia- Gastrocnemius-Muskelschnitten von WT- und C5aR-Knockout-Tieren. Der Endothelzellmarker CD31 ist in grün dargestellt, der Zellkernmarker DAPI ist blau. Die Maßstabsbalken repräsentieren 20 μ m.*

3.9 Unter systemischer Thrombozytendepletion besteht kein Unterschied im Angiogeneseniveau zwischen WT- oder C5aR-Knockout-Tieren in vivo

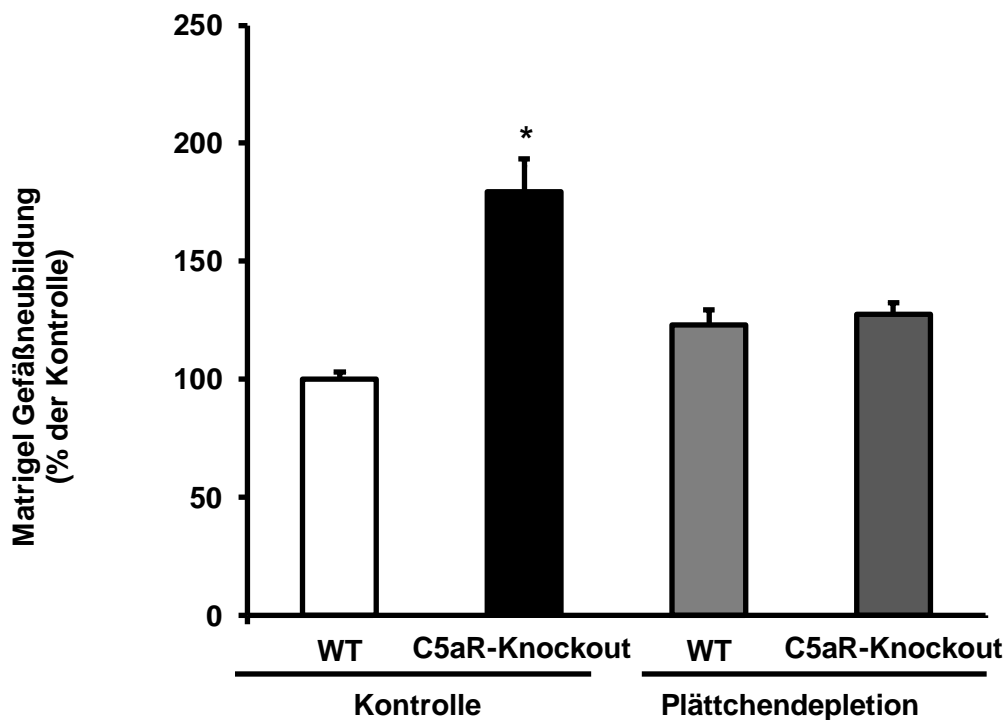
Es wurde bereits gezeigt, dass der C5a-Rezeptor antiangiogene Effekte vermittelt und dessen Abwesenheit folglich zu einem gesteigerten Angiogeneseniveau führt (Langer et al., 2010). Um zu evaluieren, welche Rolle der thrombozytäre C5a-Rezeptor hierbei spielt, wurden hier Thrombozyten in vivo

3. Ergebnisse

systemisch depletiert. Hierzu wurde Thrombozytendepletionsserum verwendet, welches nach intraperitonealer Injektion zu einer zuverlässigen und fast vollständigen Depletion der Thrombozyten führt (Schleicher et al., 2015). Im Matrigel-Assay zeigte sich nach Applikation von Thrombozytendepletionsserum, dass kein signifikanter Unterschied im Angiogeneseniveau nach 7 Tagen zwischen WT- und C5aR-Knockout-Tieren mehr besteht (Abb. 16 A).

Auch im Hindlimb-ischemia-Assay zeigte sich, dass die Revaskularisation bei C5aR-Knockout-Tieren, bei denen Thrombozyten systemisch depletiert wurden, während der ersten 6 Tage nach Induktion der Ischämie sich nicht signifikant von der von WT-Tieren unterscheidet (Abb. 16 B).

A



3. Ergebnisse

B

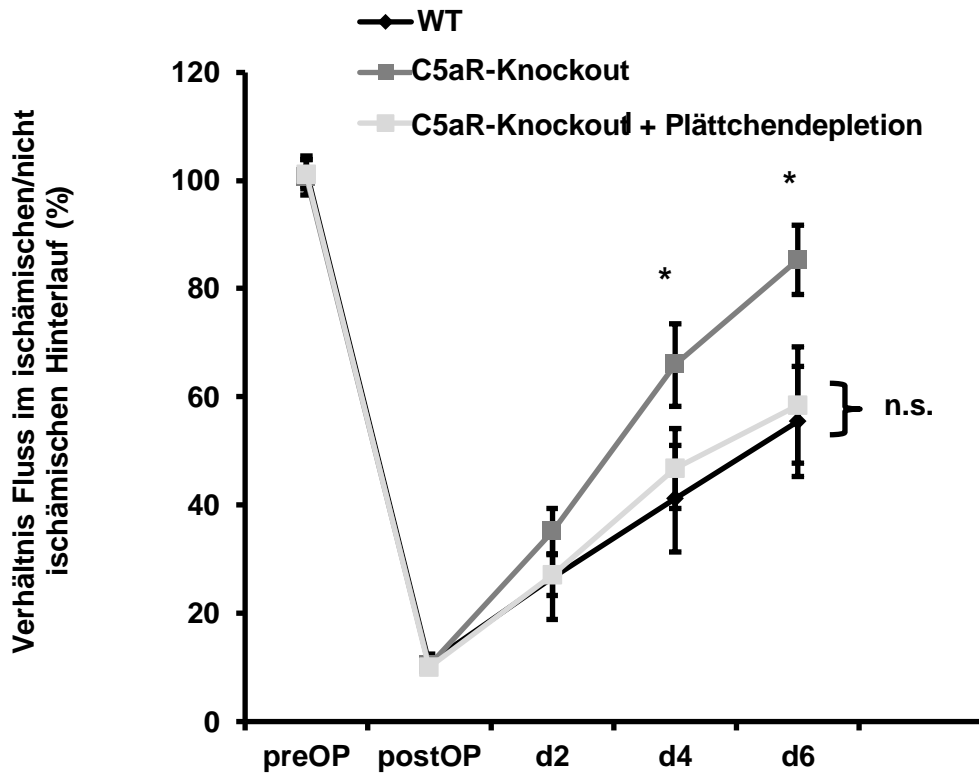


Abb. 16: **WT- und C5aR-Knockout-Mäuse haben unter systemischer Thrombozytendepletion kein signifikant voneinander verschiedenes Angiogeneseniveau im Matrigelplug-Assay und dem Hindlimb-ischemia-Assay**

A Matrigel wurde mit dem endothelialen Wachstumsfaktor bFGF angereichert und subkutan in WT- oder C5aR-Knockout-Mäuse injiziert. Zusätzlich wurde in einer zusätzlichen Gruppe bei WT- und C5aR-Knockout-Tieren intraperitoneal Thrombozytendepletionsserum an Tag 1 und 4 appliziert, in den übrigen Kontrollgruppen lediglich Kontrollserum. Nach 7 Tagen wurden die Matrigelplugs explantiert und die Gefäßneubildung darin histologisch als Fläche der Zellkerne pro Matrigelplug quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 6-8 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Fläche der Zellkerne pro Matrigel-Plug in WT-Tieren, welche Kontrollserum erhalten haben. * steht für $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

*B WT- und C5aR-Knockout-Mäuse wurden der Hindlimb-ischemia-Operation unterzogen. Zusätzlich wurde in einer Gruppe sowohl bei C5aR-Knockout-Tieren intraperitoneal Thrombozytendepletionsserum an Tag 1 und 4 appliziert, in der Kontrollgruppe lediglich Kontrollserum. Nach Ligation der Femoralarterie wurde die Durchblutung der unteren Extremität mittels Laser-Doppler-FluXimetrie präoperativ, postoperativ sowie an Tag 2, 4 und 6 gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 7 operierte Tiere) der Durchblutungswerte im Verhältnis operierte zu nicht operierte Extremität als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die mittlere Durchblutung der operierten im Verhältnis zur nicht operierten Extremität bei WT-Mäusen, welche Kontrollserum erhalten haben. * steht für $p < 0,05$. Abkürzungen: preOP = präoperativ; postOP = postoperativ; d = Tag, n.s. = nicht signifikant.*

3.10 Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout Mäuse senkt deren erhöhtes Angiogeneseniveau in vivo

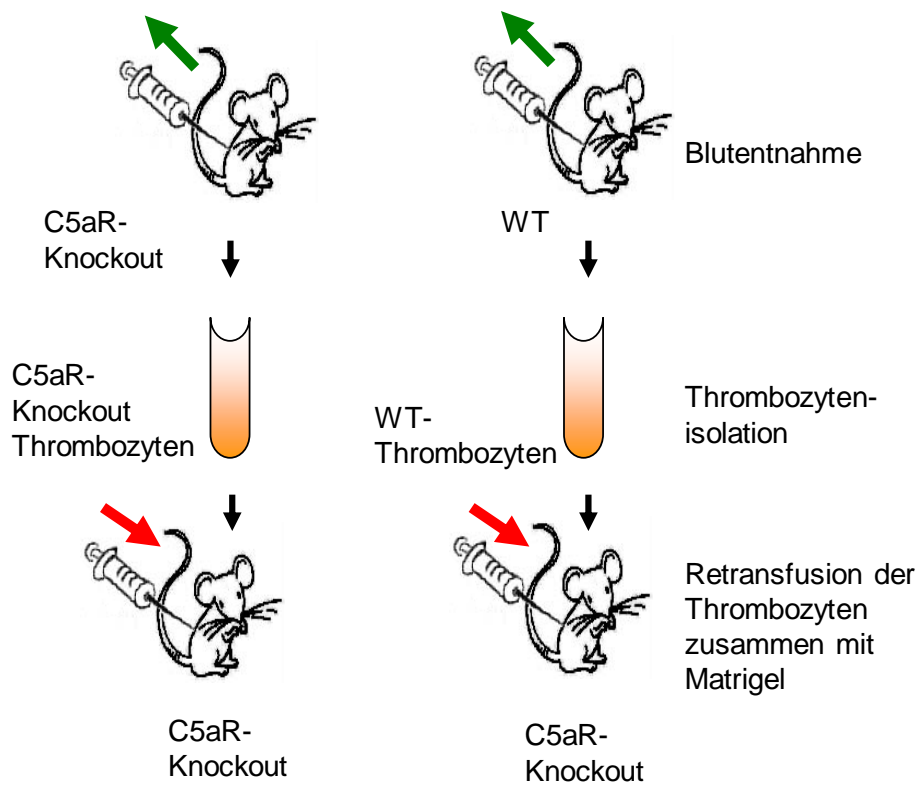
Wir haben bereits gezeigt, dass sich Thrombozytendepletion auf das Angiogeneseniveau von WT- und C5aR-Knockout-Tieren auswirkt (s. 3.9). In einem weiteren Experiment haben wir untersucht, welchen Effekt die Hinzugabe von Thrombozyten mit oder ohne intakten C5a-Rezeptor im Matrigelplug-Assay auf das Angiogeneseniveau ausübt. Hierzu haben wir Thrombozyten aus WT- und C5aR-Knockout-Tieren isoliert. Daraufhin wurde eine definierte Zahl an Thrombozyten in Matrigel resuspendiert, welches im kalten Zustand flüssig ist, und diese Suspension dann in C5aR-Knockout-Tiere injiziert. Hierdurch wurden also C5aR-positive Blutplättchen in C5aR-Knockout-Mäuse retransfundiert. Abb. 17 A illustriert das Prinzip der Retransfusion. Hierbei zeigte sich, dass mit WT-Thrombozyten angereichertes Matrigel in C5aR-Knockout-Tieren zu einem reduzierten Angiogeneseniveau führte. Dieser signifikante Effekt konnte nicht beobachtet werden, wenn das Matrigel mit C5aR-Knockout-Thrombozyten angereichert wurde (Abb. 17 B).

Als Vorbereitung dieses Experiments haben wir ebenfalls untersucht, ob Thrombozyten eine Resuspension in kaltem Matrigel funktionell überstehen. Sollte dies nicht der Fall sein, so könnte man nicht davon ausgehen, dass WT-Thrombozyten im Matrigel in C5aR-Knockout-Mäusen den beobachteten antian-

3. Ergebnisse

giogenen Effekt vermitteln. In der Tat konnten wir aber zeigen, dass Thrombozyten, welche nach Suspension in Matrigel mit dem Matrigel gelierten und aus einem lysierten Plug wieder isoliert wurden, immer noch auf Stimulation mit ADP hin eine Hochregulation von P-Selektin gezeigt haben. Die Zellen waren also im Matrigel und sogar nach Isolation aus Matrigel funktionell weiterhin aktiv.

A



3. Ergebnisse

B

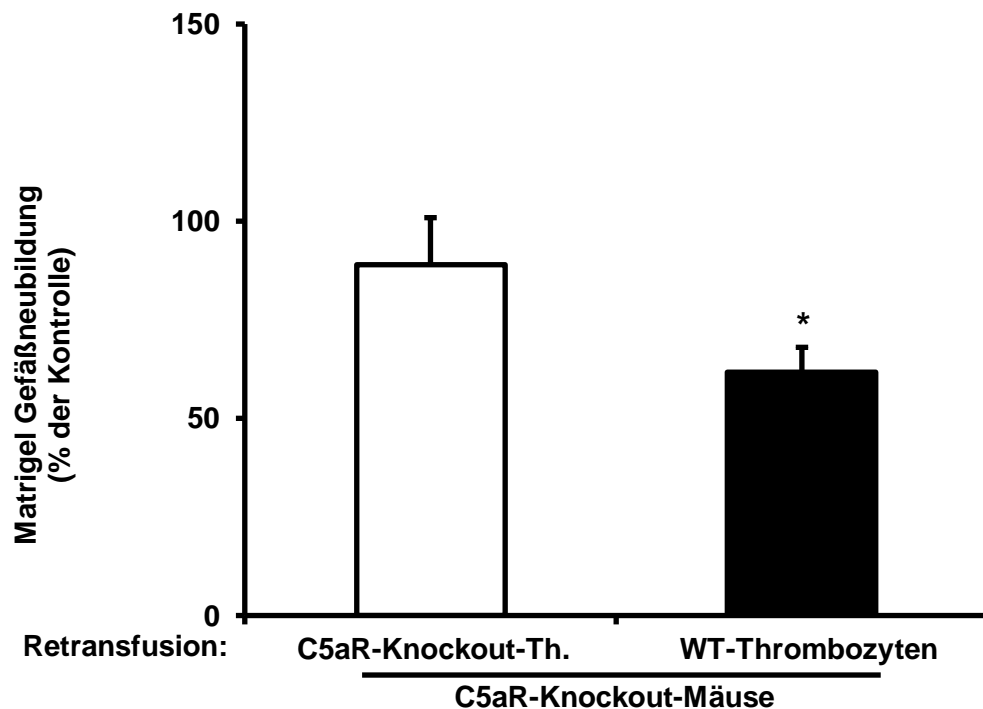


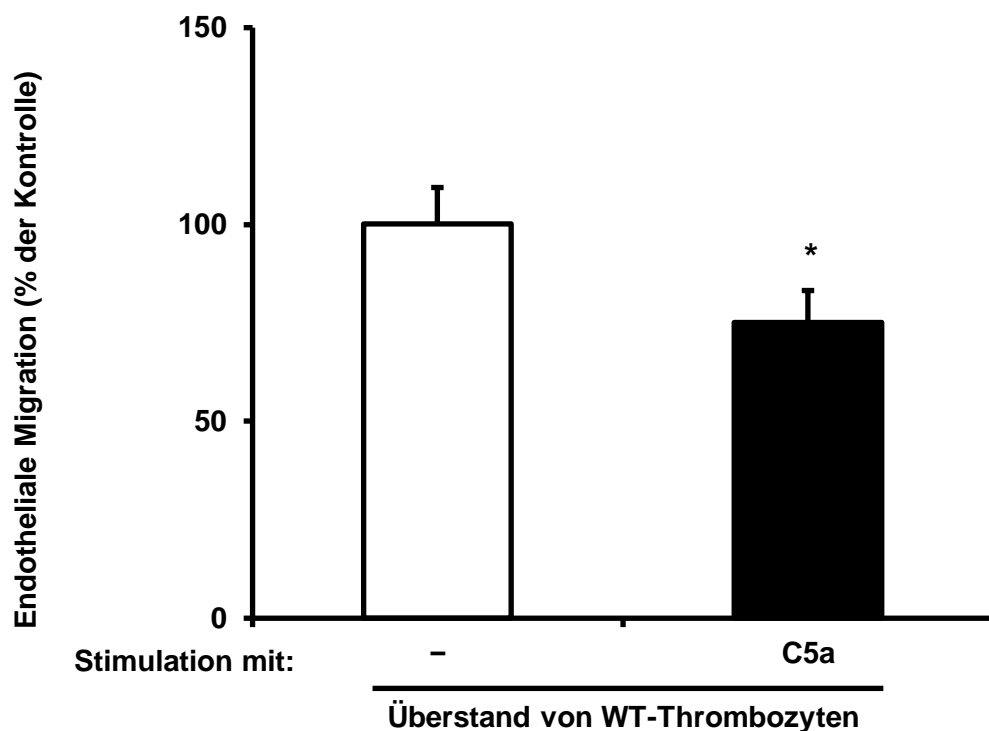
Abb. 17: **Rescue-Experiment: Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout-Mäuse führt zu einer signifikanten Reduktion des Angiogeneseniveaus im Matrigel-Assay**

- A Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Rescue-Experiments. Frisch isolierte WT- oder C5aR-Knockout-Thrombozyten wurden in Matrigel resuspendiert. Dieses wurde dann mit dem endothelialen Wachstumsfaktor bFGF angereichert und in C5aR-Knockout-Tiere injiziert, wo dieses dann ausgehärtet ist
- B Sieben Tage nach Matrigel-Injektion wurde die Angiogenese in den mit WT- oder C5aR-Knockout-Thrombozyten angereicherten Matrigelplugs histologisch als Fläche der Zellkerne pro Matrigelplug quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 7-8 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Fläche der Zellkerne pro Matrigelplug in Matrigelplugs in C5aR-Knockout-Tieren, welche nur mit Medium und nicht mit Thrombozyten angereichert wurden. * steht für $p < 0,05$. Abkürzungen: Th. = Thrombozyten.

3. Ergebnisse

3.11 Einfluss von C5a-stimuliertem Thrombozytenüberstand auf die Migration von Endothelzellen in vitro

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass der thrombozytäre C5a-Rezeptor bei der Modulation der Angiogenese relevant ist und einen inhibitorischen Effekt auf die Angiogenese ausübt. Im Folgenden soll nun untersucht werden, welcher Mechanismus der thrombozytenvermittelten C5aR-abhängigen Inhibition der Angiogenese zugrunde liegt. Wie unter 1.4.3 ausgeführt, enthalten Thrombozyten eine Vielzahl pro- als auch antiangiogener Faktoren (Stellos et al., 2010). Daher haben wir geprüft, ob Überstand von Thrombozyten allein bereits einen Effekt auf Endothelzellen in vitro ausübt. Dies würde einen sekretorischen Mechanismus nahelegen. Frisch isolierte gewaschene Thrombozyten aus WT-Mäusen wurden daher bei 37°C in calciumhaltigem Medium mit C5a stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mit einem subkonfluenten Endothelzellrasen koinkubiert, bei dem bereits ein „scratch“ gesetzt war. Es zeigte sich, dass die Migrationsaktivität der Endothelzellen durch C5a-stimulierten Thrombozytenüberstand signifikant inhibiert wurde (Abb. 18).



3. Ergebnisse

Abb. 18: Koinkubation von MHEC5-T Endothelzellen mit C5a-stimuliertem WT-Thrombozytenüberstand führt zu einer Inhibition der endothelialen Migration

*Murine Endothelzellen der Zelllinie MHEC5-T wurden kultiviert, wie unter 2.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz wachsen gelassen. Daraufhin wurde mit einer Pipettenspitze ein Streifen des Zellrasens abgekratzt. Frisch isolierte Thrombozyten aus WT-Mäusen wurden bei 37°C in calciumhaltigem Medium mit C5a stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mit dem vorbereiteten Endothelzellrasen koinkubiert. Als Kontrollbedingung verwendeten wir die Koinkubation mit Tyrodes-Puffer pH 7,4. Nach 16,5 Stunden wurde die überwachsene Fläche quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 4 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die überwachsene Fläche in der Gruppe, die mit Kontroll-Überstand koinkubiert wurde. * steht für $p < 0,05$*

3.12 Einfluss von C5a-stimuliertem Thrombozytenüberstand auf die Tube formation von Endothelzellen in vitro

Thrombozyten scheinen ihren antiangiogenen C5aR-vermittelten Effekt durch Sekretion angiogen aktiver Substanzen auszuüben. Um dieser Hypothese näher nachzugehen, haben wir frisch isolierte gewaschene Thrombozyten aus WT- und C5aR-Knockout-Mäusen bei 37°C in calciumhaltigem Medium mit C5a stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mit Endothelzellen koinkubiert, welche auf geliertem Matrigel ausgesät worden waren. Es zeigte sich, dass C5a-stimulierter Thrombozytenüberstand von WT- aber nicht von C5aR-Knockout-Tieren die endotheliale Tube formation signifikant reduzierte, während der Überstand von C5aR-Knockout-Thrombozyten keinen signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe aufwies, die lediglich mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 koinkubiert wurde (Abb. 19).

3. Ergebnisse

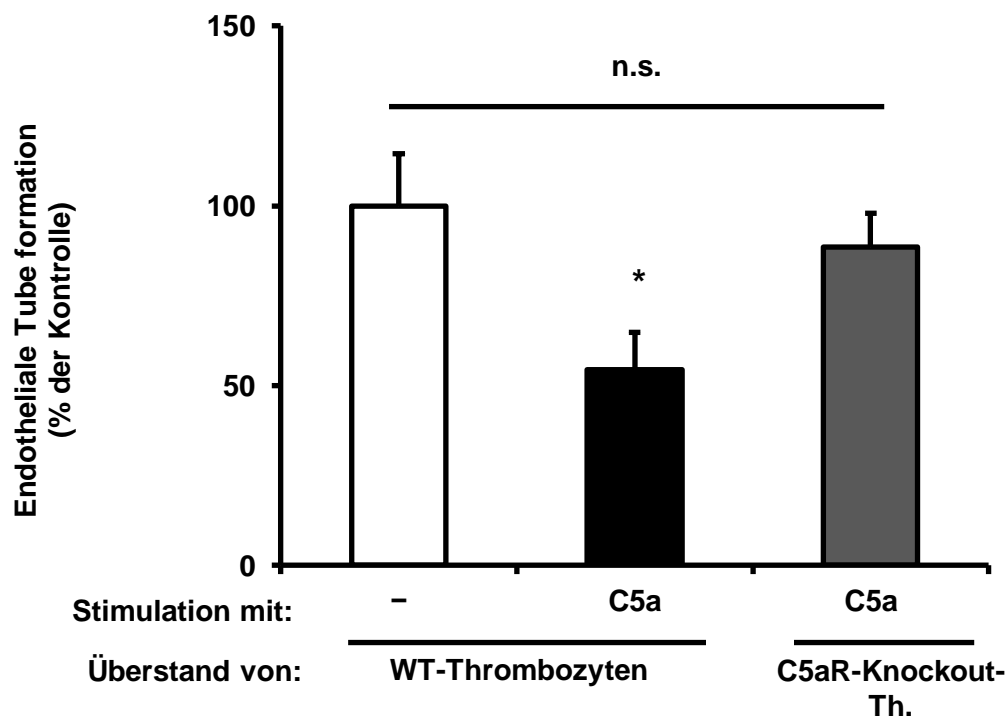


Abb. 19: **Koinkubation von MHEC5-T Endothelzellen mit C5a-stimuliertem WT-Thrombozytenüberstand führt zu einer Inhibition der endothelialen Tube formation**

Murine Endothelzellen der Zelllinie MHEC5-T wurden kultiviert, wie unter 2.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden auf Matrigel ausgesät. Frisch isolierte Thrombozyten aus WT- und C5aR-Knockout-Mäusen wurden bei 37°C in calciumhaltigem Medium mit C5a stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mit den auf Matrigel ausgesäten Endothelzellen koinkubiert. Als Kontrollbedingung verwendeten wir die Koinkubation mit Tyrodes-Puffer pH 7,4. Nach 6,5 Stunden wurde die Gesamtlänge der gebildeten tubes quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF ($n=4$ unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Gesamtlänge der tubes nach Koinkubation mit Kontroll-Überstand. * steht für $p<0,05$. Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant; Th. = Thrombozyten

3.13 Thrombozyten sekretieren PF4 nach Stimulation mit C5a in vitro

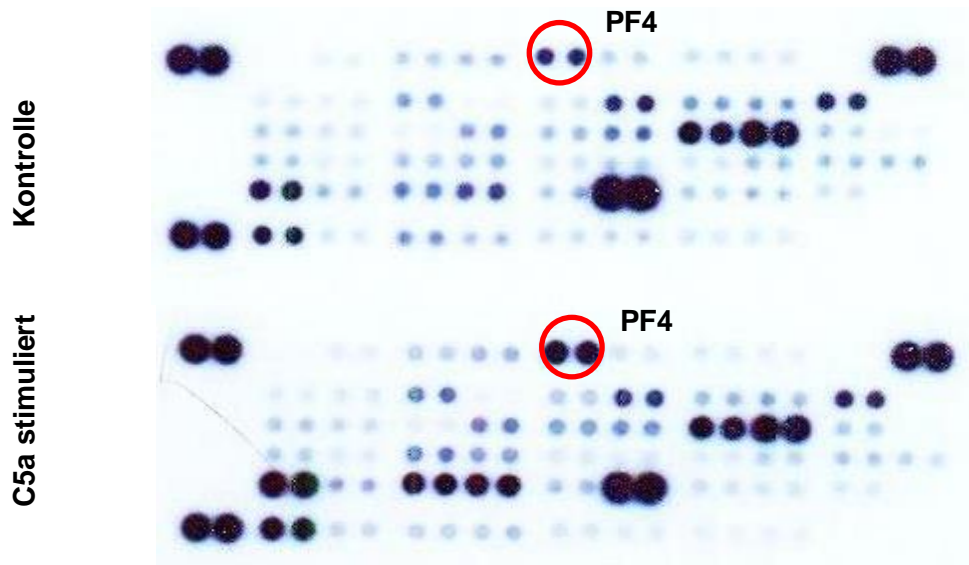
Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass Thrombozyten mit intaktem C5a-Rezeptor auf C5a-Stimulation hin lösliche Faktoren zu sekretieren scheinen, welche die Migration und Tube formation von Endothelzellen in vitro inhibieren. Da Thrombozyten eine große Zahl verschiedener Faktoren enthalten

3. Ergebnisse

(Golebiewska and Poole, 2015; Stellos et al., 2010), haben wir zunächst mittels eines Screening-Verfahrens untersucht, welche angiogen aktiven Faktoren durch C5a-Stimulation spezifisch reguliert werden. Frisch isolierte gewaschene WT-Thrombozyten wurden in calciumhaltigem Medium bei 37°C mit C5a für 10 min stimuliert und der Überstand wurde gewonnen. Daraufhin wurde dieser mittels des Angiogenesis Proteome Profilers von R&D (R&D, Minneapolis, USA) analysiert. Hierbei zeigte sich, dass einige angiogen aktive Substanzen nach C5a-Stimulation spezifisch reguliert wurden. Abb. 20 A stellt den graphischen Readout des Versuchs dar. In Tabelle 7 finden sich die gemessenen Intensitäten numerisch ausgedrückt. Die höchste Konzentration nach C5a-Stimulation konnte für das bekanntermaßen antiangiogen wirkende Peptid platelet factor 4 (PF4) gemessen werden. PF4 ist ein Chemokin, welches in hohen Konzentrationen in Thrombozyten vorkommt, dort in α -Vesikeln gespeichert ist, und die Angiogenese inhibitorisch beeinflusst (Aidoudi-Ahmed and Bikfalvi, 2010). Thrombozyten scheinen also auf C5a-Stimulation hin unter anderem PF4 freizusetzen. Dieser Befund wurde mittels konventionellem ELISA bestätigt. Frisch isolierte gewaschene Thrombozyten wurden in calciumhaltigem Medium mit C5a für 10 min stimuliert und der Überstand gewonnen. Als Kontrollbedingung wurde die Stimulation mit Tyrodes-Puffer durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der Überstand von Thrombozyten nach C5a-Stimulation eine deutlich erhöhte Konzentration an PF4 gegenüber dem Kontroll-stimulierten-Überstand aufwies (Abb. 20 B).

3. Ergebnisse

A



B

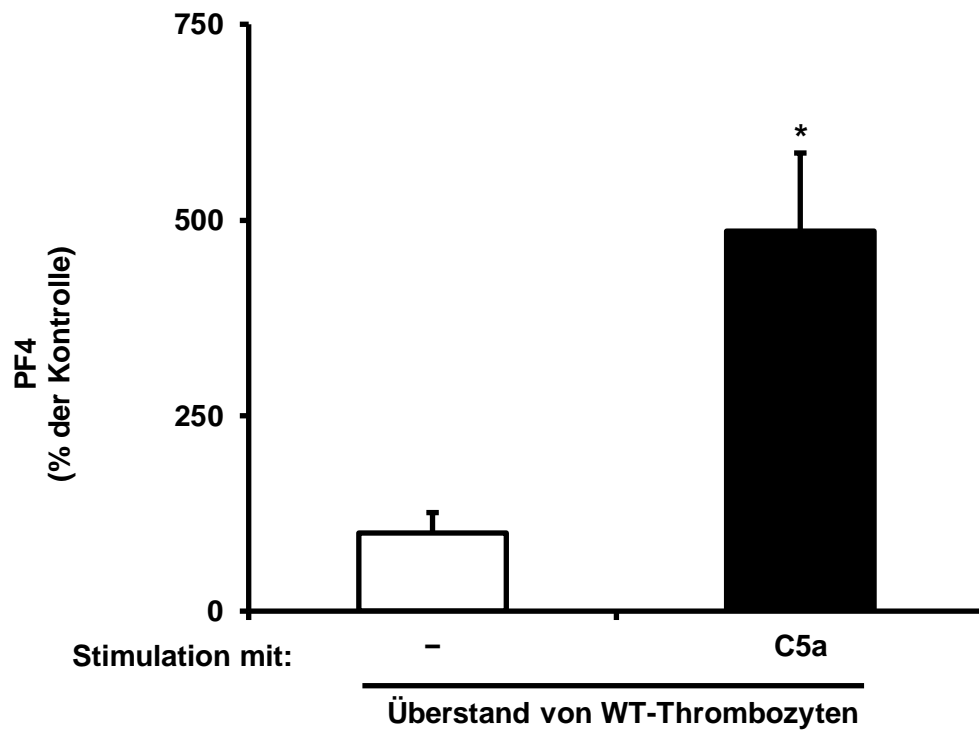


Abb. 20: *Das Sekretom von frisch isolierten Thrombozyten wird durch C5a-Stimulation spezifisch beeinflusst: Thrombozyten sekretieren C5a-getriggert PF4*

3. Ergebnisse

- A *Frisch isolierte Thrombozyten wurden in calciumhaltigem Medium mit C5a für 10 Minuten stimuliert. Der Überstand wurde gewonnen und mittels des Proteome-Profiler Angiogenesis Kit von R&D untersucht. Die Auswertung dieses Assays erfolgt mittels Belichtung eines Röntgenfilms durch radioaktive Strahlung, welche je nach Konzentration des jeweiligen Faktors im untersuchten Überstand in der Intensität variiert. Dargestellt ist das resultierende Bild eines einzelnen repräsentativen Experiments, wie es sich auf dem Röntgenfilm darstellte. Einzelne Punkte repräsentieren in Duplikaten aufgetragene Faktoren. Oben findet sich das Ergebnis des Kontroll-stimulierten Überstands, unten ist die C5a-stimulierte Probe abgebildet. Markiert ist das Signal für PF4.*
- B *Mittels konventionellem ELISA wurden die Konzentrationen an PF4 von Thrombozyten-Überstand mit Kontroll-Stimulation oder C5a-Stimulation untersucht und die PF4-Konzentration bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 10 unabhängige Experimente) als % der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die PF4-Konzentration im Kontroll-stimulierten Thrombozyten-Überstand. * steht für $p < 0,05$.*

Tabelle 7: Messwerte des Proteome Profiler Angiogenesis Kits (R&D) von WT-Thrombozytenüberstand nach Stimulation mit C5a oder Kontrolle

	WT-Thrombozyten stimuliert mit	
Angiogen aktiver Faktor	Kontrolle	C5a
	<i>Pixelldichte</i>	
platelet factor 4	16208	21841
IGFBP-3	19194	20221
osteopontin	12644	19915
angiopoietin-1	11078	18648
IGFBP-2	16724	17941
SDF-1	12879	17225
PDGF-AA	6536	16574
PDGF- AB/PDGF- BB	8757	16556
basic-FGF	11535	11011

3. Ergebnisse

endostatin/Collagen XVIII	9262	9585
DPP IV	5190	7219
HB-EGF	5397	6585
KC	3475	6446
IGFBP-1	6117	6178
HGF	3939	5829
leptin	4396	4901
pentraxin- 3	4160	4771
angiogenin	4321	4699
acidic-FGF	4705	4556
endothelin- 1	4980	4303
PD-ECGF	4286	4286
amphiregulin	3634	3760
thrombospondin- 2	3940	3751
endoglin	2019	3741
MMP 9	3889	3641
serpin F1	3574	3574
KGF	3434	3554
IL- 10	3340	3551
MMP 8	4344	3448
IL1- α	3189	3397
serpin E1	2215	3018
NOV	4320	2851
fractalkine	2167	2627
MIP- 1a	3469	2544
angiopoietin-3	3105	2405
PIGF- 2	2366	2366
TIMP- 1	2562	2312
porlactin	3490	2132
coagulation factor III	2779	1998
proliferin	2426	1998
MCP- 1	2120	1862
DLL4	1288	1840

3. Ergebnisse

Cyr61	1662	1779
ADAMTS1	1610	1757
TIMP_4	2291	1757
IP-10	1499	1755
MMP 3	2104	1700
GM- CSF	1015	1524
VEGF- β	2165	1496
CXCL16	2445	1476
VEGF	2487	1441
EGF	691	792
IL1- β	1175	531

3.14 Unter systemischer PF4-Inhibition hat Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout-Mäuse keinen Einfluss auf das Angiogeneseniveau im Matrigelplug-Assay in vivo

Wir haben beschrieben, dass Thrombozyten antiangiogenes PF4 nach C5a-Stimulation sekretieren. Der Überstand von C5a-stimulierten Thrombozyten inhibiert die endothelialen Funktionen Migration und Tube formation in vitro. Um zu untersuchen, ob dieser Mechanismus auch für die Modulation der Angiogenese durch Thrombozyten in vivo relevant ist, haben wir den Matrigelplug-Assay durchgeführt. C5aR-Knockout-Mäusen wurde Matrigel subkutan injiziert, welches mit WT-Thrombozyten oder als Kontrolle Tyrodes-Puffer angereichert worden war. Zusätzlich wurde den Tieren in der Gruppe mit Thrombozyten-supplementiertem Matrigel ein Antikörper intravenös appliziert, welcher die Wirkung von PF4 in vivo blockiert (Hartwig et al., 2013). Eine weitere Gruppe von C5aR-Knockout-Tieren erhielt mit WT-Thrombozyten supplementiertes Matrigel aber Kontroll-IgG intravenös statt des blockierenden PF4-Antikörpers. Wie bereits unter 3.10 dargestellt, zeigte sich in der Gruppe von C5aR-Knockout-Tieren welche mit WT-Thrombozyten supplementiertes Matrigel erhalten und Kontroll-IgG intravenös verabreicht bekommen haben, ein signifikant niedrigeres Angiogeneseniveau. Interessanterweise konnte dieser Effekt aber nicht beobachtet

3. Ergebnisse

werden, wenn PF4 mittels des intravenös verabreichten blockierenden Antikörpers inhibiert wurde. Diese Gruppe zeigte kein signifikant anderes Angiogeneseniveau wie diejenige, bei der das Matrigel nur mit Tyrodes-Puffer supplementiert wurde (Abb. 21).

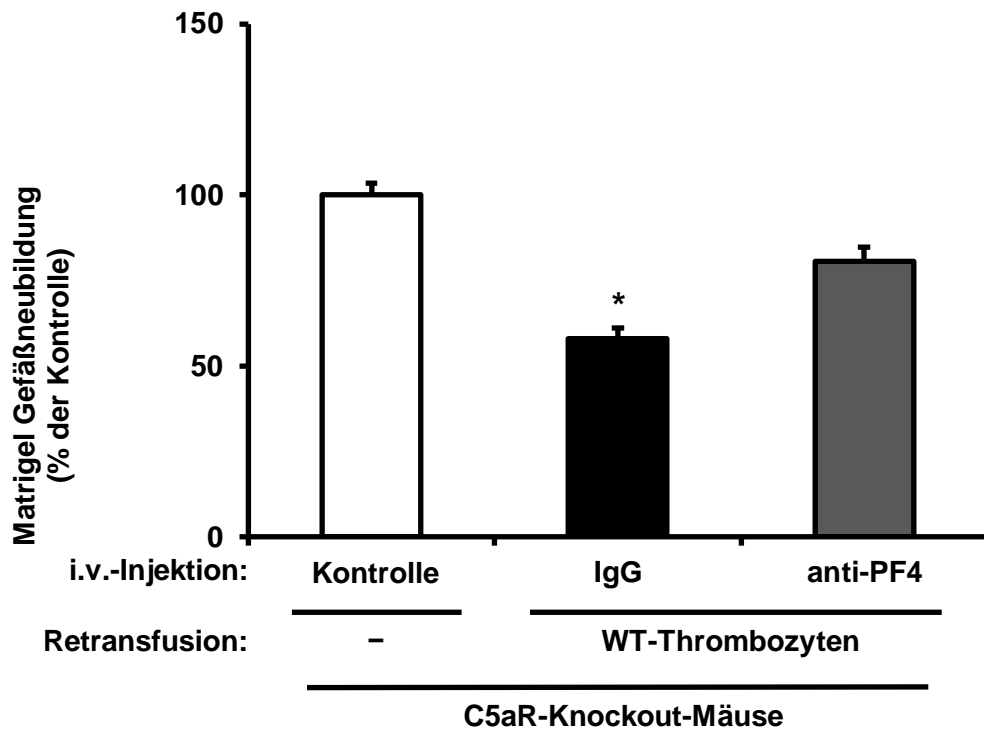


Abb. 21: *Rescue-Experiment mit PF4-Blockade: Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout-Mäuse führt bei gleichzeitiger PF4-Inhibition nicht zu einer signifikanten Reduktion des Angiogeneseniveaus im Matrigel-Assay*

3. Ergebnisse

*Frisch isolierte Thrombozyten aus WT-Mäusen wurden in mit bFGF angereicher-
tem Matrigel resuspendiert und dieses subkutan in C5aR-Knockout-Mäuse inji-
ziert. Die Kontrollgruppe erhielt mit Tyrodes-Puffer und bFGF angereichertes
Matrigel. Am Tag der Matrigel-Injektion wurde den Mäusen, welche mit WT-
Thrombozyten angereichertes Matrigel erhalten haben, jeweils blockierender anti-
PF4-Antikörper oder ein dem IgG-Typ entsprechendes Kontroll-Immunglobulin in-
travenös appliziert. Die Mäuse der Kontrollgruppe erhielten lediglich eine Injektion
PBS intravenös. Sieben Tagen nach Matrigel-Injektion wurde die Angiogenese in
den Matrigelplugs histologisch als Fläche der Zellkerne pro Matrigelplug quanti-
fiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SF (n= 7-9 unabhängige Experimente) als %
der Kontrolle. Die 100%-Kontrolle repräsentiert die Fläche der Zellkerne pro Ma-
trigelplug in C5aR-Knockout-Tieren, welche mit Tyrodes-Puffer und bFGF ange-
reichertes Matrigel und PBS intravenös erhalten haben. * steht für $p < 0,05$.*

4 DISKUSSION

Das Wissen um die Regulation der Angiogenese ist vielfältig. Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl Komponenten des Komplementsystems wie auch thrombozytäre Faktoren dabei eine Rolle spielen (Etulain et al., 2014; Zaslavsky et al., 2010; Kisucka et al., 2006; Patzelt and Langer, 2012; Packham et al., 2014; Stellos et al., 2010; Klement et al., 2009; Chatterjee et al., 2011; Battinelli et al., 2011; Italiano et al., 2008; Rutkowski et al., 2010; Nozaki et al., 2006; Girardi et al., 2006; Rafail et al., 2015; Langer et al., 2010; Feng et al., 2011). Bisher wurde aber nicht systematisch untersucht, ob zwischen beiden Systemen ein Zusammenhang in Bezug auf die Regulation der Angiogenese besteht. Diese Arbeit demonstriert erstmals einen solchen Zusammenhang.

Angiogenese ist sowohl bei kardiovaskulären als auch bei malignen Erkrankungen von großer Bedeutung (Carmeliet, 2005). Im kardiovaskulären Kontext ist sie insbesondere bei der Regeneration nach akuten Gefäßverschlüssen oder zur Kompensation bei chronisch-progredienten Gefäßverengungen aber auch bei der Progression und insbesondere der Plaqueruptur in der Atherosklerose von großer Bedeutung. Die Modulation der Thrombozytenfunktion stellt seit Langem ein etabliertes therapeutisches Prinzip bei kardiovaskulären Erkrankungen dar (Dütting et al., 2012). Auch Komplementmodulatoren werden bei diesen Erkrankungen als therapeutische Option evaluiert (Pavlov et al., 2012; Schwaeble et al., 2011; Zhou et al., 2012, 2013) und wurden bereits bei vaskulären Erkrankungen erfolgreich eingesetzt (Röth et al., 2011). Ein Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem und Thrombozyten bei der Regulation der Angiogenese ist daher von klinischer Bedeutung.

Diese Arbeit beschreibt erstmals eine mögliche Rolle des Anaphylatoxinrezeptors C5aR auf Thrombozyten bei der Modulation der Angiogenese. Es konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten einen antiangiogenen Effekt vermitteln können. Dies wurde in vivo in einem Modell der wachstumsfaktorinduzierten Angiogenese demonstriert. In vitro zeigte sich, dass der auf Thrombozyten exprimierte C5a-Rezeptor einen inhibitorischen Effekt auf die Angiogenese ausübt. Hierfür

4. Diskussion

wurden Thrombozyten aus Mäusen verwendet, bei denen der Rezeptor genetisch ausgeschaltet war, sogenannten Knockout-Mäusen (Hopken et al., 1996; Phieler et al., 2013). Dies ist ein häufig verwendetes Prinzip zur Untersuchung der Funktion spezifischer Thrombozytenproteine. Schließlich konnte in vivo bestätigt werden, dass der thrombozytäre C5a-Komplementrezeptor die Angiogenese inhibiert. C5aR-Knockout-Mäuse wiesen ein erhöhtes Angiogeneseniveau in einem in vivo Modell wachstumsfaktorinduzierter und hypoxiegetriggelter Angiogenese auf. Dieser Phänotyp ließ sich durch systemische Depletion der Thrombozyten abschwächen. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich das gesteigerte Angiogeneseniveau in C5aR-Knockout-Tieren durch Rekonstituierung mit Thrombozyten mit intaktem C5a-Rezeptor senken lässt. Schlussendlich scheint der inhibitorische Effekt des C5a-Rezeptors auf die Angiogenese über die Sekretion von antiangiogenem PF4 aus Thrombozyten nach C5a-Stimulation vermittelt zu sein.

In Bezug auf die Angiogenese im Tumormilieu wurde bereits beschrieben, dass Thrombozyten eine antiangiogene Rolle haben können. Im Frühstadium des Tumorwachstums konnte Zaslavky et al. anhand eines Mäuse-Tumormodells in vivo zeigen, dass Thrombospondin-1, welches durch Thrombozyten sekretiert wird, die Angiogenese in vivo inhibiert (Zaslavsky et al., 2010). Darüber hinaus konnten Italiano et al. zeigen, dass pro- und angiogene Faktoren in Thrombozyten meist in α -Granula gespeichert sind und auf spezifische Stimulatoren hin freigesetzt werden können (Italiano et al., 2008). Dies spricht für eine Modulation der Angiogenese durch Thrombozyten, welche spezifisch ist, im Gegensatz zu einer bloßen Beeinflussung. Des Weiteren wurde diesbezüglich erst kürzlich beschrieben, dass die Freisetzung des antiangiogenen Angiostatin aus Thrombozyten einer anderen Kinetik folgt als die des proangiogenen VEGF. Dies wurde im Rahmen der Thrombusbildung beobachtet (Radziwon-Balicka et al., 2013). Auch dies spricht für eine modulatorische Funktion von Thrombozyten in der Angiogenese.

Trotzdem gibt es kaum Erkenntnisse über die Regulierung der Freisetzung pro- oder antiangiogener Faktoren aus Thrombozyten. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2005 zeigen Ma, Wallace et al., dass Proteinase-aktivierte

4. Diskussion

Rezeptoren 1 und 4 (PAR1 und PAR4) die Freisetzung von Angiostatin und VEGF aus humanen Thrombozyten herunterregulieren können, was sich mittels spezifischer Inhibitoren pharmakologisch wiederum inhibieren lässt (Ma et al., 2005). 2011 haben Feng et al. eine Arbeit zur Rolle von Thrombozyten in der hypoxiegetriggerten Angiogenese veröffentlicht, in der sie zeigen konnten, dass Thrombozyten als Mediatoren zwischen dem Knochenmark und dem hypoxischen Gewebe fungieren und die Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark über einen sekretorischen Mechanismus steuern (Feng et al., 2011). All dies legt nahe, dass Thrombozyten in der Tat eine modulatorische Funktion in der Angiogenese einnehmen. Die hier vorliegende Arbeit beschreibt einen spezifischen Mechanismus dieser Modulation. Es konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten im angiogen aktiven Gewebe vorkommen. Dies wurde mittels des Hindlimb-ischemia-Assays demonstriert, eines Modell für hypoxiegetriggerte Angiogenese.

Es stellt sich die Frage, inwiefern sich diese Erkenntnisse weiter nutzen lassen. So wird in Zukunft zu klären sein, ob thrombozytäre Faktoren als Biomarker für das Angiogeneseniveau in einem spezifischen Gewebe herangezogen werden können. In der Atherosklerose gibt es bereits Hinweise darauf, dass thrombozytäre Faktoren als Biomarker eingesetzt werden könnten, da sie mit klinisch bedeutsamen Parametern korrelieren, beispielweise der Thrombozytenaktivierung oder thrombozytengebundenem oxLDL (Daub et al., 2010; Nording et al., 2016; Patzelt et al., 2015a).

In dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, bei denen der Einfluss einer systemischen Thrombozytendepletion auf die wachstumsfaktorinduzierte und die hypoxiegetriggerte Angiogenese untersucht wurde. Hierbei zeigte sich ein antiangiogener Effekt der Thrombozyten, da deren Depletion zu einem erhöhten Angiogeneseniveau führte. Trotzdem erscheint es wahrscheinlich, dass Thrombozyten in anderen Situationen als den hier untersuchten auch proangiogene Effekte haben können. Auch die Tatsache, dass potente proangiogene Faktoren wie bFGF oder VEGF in Thrombozyten gespeichert sind, legt dies nahe (Stellos et al., 2010). Proangiogene Effekte von Thrombozyten wurden bereits mehrfach beschrieben (Ross et al., 1974; Knighton et al., 1982;

4. Diskussion

Feng et al., 2011). Außerdem konnte in einer neueren Studie demonstriert werden, dass systemische Thrombozytendepletion beim sogenannten cornea micropocket Assay zu einer gesteigerten Angiogenese führt (Kisucka et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde ein antiangiogener Effekt im Matrigel-Assay und dem Hindlimb-ischemia-Assay beschrieben, welcher durch den thrombozytären C5a-Komplementrezeptor vermittelt ist. Angiogenese wird reguliert durch ein Gleichgewicht pro- als auch antiangiogener Faktoren (Cao et al., 2011). Der Netto-Effekt von Thrombozyten in der Angiogenese hängt wahrscheinlich mit den aktuellen Umgebungsfaktoren zusammen. Welche Faktoren letztlich maßgeblich die Rolle von Thrombozyten in der Angiogenese bestimmen, muss in Zukunft herausgearbeitet werden. C5a scheint über den thrombozytären C5a-Rezeptor hierbei von Bedeutung zu sein, wie diese Arbeit zeigen konnte.

Die Rolle des Komplementsystems in der Angiogenese ist Gegenstand zahlreicher Studien (Kahr, 2010). Im Jahr 2010 wurde durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlicht, dass das Anaphylatoxin C5a antiangiogene Effekte vermittelt. Hierbei wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem C5a die Freisetzung von VEGFR aus Makrophagen induziert (Langer et al., 2010). Wie lassen sich diese Ergebnisse mit der hier vorliegenden Arbeit in Einklang bringen? Angiogenese ist ein ubiquitär ablaufender Prozess, welcher auf ein Gleichgewicht pro- als auch antiangiogener Einflussfaktoren angewiesen ist (Cao et al., 2011; Carmeliet, 2005). Es ist daher nicht verwunderlich, dass mehrere Zelltypen mittels Komplementrezeptoren diesen Prozess kontrollieren. Das Komplementsystem gehört zum ontogenetisch ältesten Teil des Immunsystems. Es ist über viele Speziesgrenzen hinweg gut konserviert (Ricklin et al., 2010). Als solches kontrolliert und steuert es Verbindungen zwischen verschiedenen Komponenten des Immunsystems aber auch anderer regenerativer und homöostatischer Prozesse (Ricklin and Lambris, 2013). Eine Rolle des Komplementsystems in der Angiogenese, welche über Makrophagen und Thrombozyten vermittelt wird, ist vor diesem Hintergrund gut erklärbar.

Auch Thrombozyten exprimieren Komplementrezeptoren für die Anaphylatoxine C3a und C5a (Fukuoka and Hugli, 1988; Polley and Nachman, 1978; Martel et al., 2011). Dies ist insbesondere in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen

4. Diskussion

von Bedeutung, da von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die Expression des C5a-Anaphylatoxinrezeptors auf Thrombozyten mit deren Aktivierung in einem Patientenkollektiv mit koronarer Herzerkrankung korreliert (Patzelt et al., 2015a). Die Grundlage der koronaren Herzerkrankung ist die Atherosklerose (Moreira et al., 2015). Daher lassen sich die hier gewonnenen Ergebnisse durchaus zur Hypothesengenerierung auf atherosklerotische Erkrankungen im Allgemeinen anwenden. Anhand des Matrigel-Assay, einem Modell für wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese, konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen C5aR genetisch ausgeschaltet wurde (C5aR-Knockout-Mäuse), gegenüber WT-Mäusen ein erhöhtes Angiogeneseniveau aufweisen. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen zur antiangiogenen Rolle von C5a (Girardi et al., 2006; Langer et al., 2010). Es gibt aber auch Studien, welche ein reduziertes Angiogeneseniveau bei C5aR-Knockout-Mäuse beschreiben (Nozaki et al., 2006). Auch für Mäuse, welche keinen funktionellen Komplementfaktor 3 aufweisen, wurde ein niedrigeres Angiogeneseniveau verglichen mit WT-Tieren beschrieben (Bora et al., 2005). Beide Studien beschäftigten sich allerdings mit choroidaler Gefäßneubildung im Auge, genauer der Rolle des Komplementsystems bei der Laser-induzierten choroidalen Gefäßneubildung. Diese stellt ein Modell für die altersbedingte Makuladegeneration dar. Bei der feuchten altersbedingten Makuladegeneration verschlimmern Gefäßneubildungen der Choroidea im Auge den progredienten Visusverlust. Das retinale Pigmentepithel, eine Struktur, die es in dieser Art nur im Auge gibt, spielt bei dieser Erkrankung eine zentrale Rolle (Thurman et al., 2009). Angesichts der Vielseitigkeit des Komplementsystems erscheint es möglich, dass das Komplementsystem kontextabhängig agiert. Es ist also nicht unbedingt ein Widerspruch, wenn der C5a-Rezeptor bei der AMD proangiogen wirkt, bei den in dieser Arbeit untersuchten Kontexten allerdings gegenteilig, nämlich antiangiogen.

Der Komplementrezeptor für C5a wird auf Immunzellen und Endothelzellen exprimiert (Haviland et al., 1995). Interessanterweise haben wir diesen Rezeptor auch auf Thrombozyten nachweisen können, welche klassischerweise für die Hämostase und Geweberegeneration zuständig sind. Auch wenn der C5a-Komplementrezeptor auf Thrombozyten bereits beschrieben worden ist (Martel et al.,

4. Diskussion

2011; Patzelt et al., 2015a), so haben wir nun erstmals eine funktionelle Rolle dieses Rezeptors beschrieben. Interessant ist, dass wir zeigen konnten, dass die Expression dieses Rezeptors durch die Aktivierung von Thrombozyten beeinflusst wird (Nording et al., 2016). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit früheren Berichten, die einen Zusammenhang zwischen Thrombozytenaktivierung und Komplementaktivierung gezeigt haben (Martel et al., 2011).

Sowohl in vitro als auch in vivo inhibiert C5a vermittels des thrombozytären C5a-Rezeptors die Angiogenese. Diese Arbeit konnte einen Mechanismus aufzeigen, der dieser Beobachtung zugrunde liegt. Auf C5a-Stimulation hin sekretieren Thrombozyten PF4, welches antiangiogen auf Endothelzellen wirkt (Maurer et al., 2006). Dies wurde in vitro mittels Analyse des Effektes von C5a-stimuliertem Thrombozytenüberstand auf verschiedene Endothelzellfunktionen wie auch in vivo mittels anti-PF4-Antikörper-Applikation untersucht. Dieser Mechanismus ist sicher einer von vielen weiteren, welche es in Zukunft aufzuklären gilt. Thrombozyten enthalten zahlreiche angiogen aktive Substanzen (Zaslavsky et al., 2010; Battinelli et al., 2011; Italiano et al., 2008; Stellos et al., 2010), welche funktionelle Bedeutung haben können. Auch auf C5a-Stimulation hin ist beispielweise nicht nur die Sekretion von PF4 reguliert, wie das Ergebnis des Proteome Profilers (Abb. 3.13 A, Tabelle 7) zeigt. Die C5a-abhängige PF4-Sekretion ist allerdings funktionell bedeutsam. Zum einen zeigte sich nach C5a-Stimulation im Thrombozytenüberstand die höchste Konzentration bei PF4. Zum anderen zeigten weitere in vivo und in vitro-Experimente, dass der Beitrag von PF4 entscheidend für den thrombozytenvermittelten C5a-Effekt ist. Über welche Stimulationswege andere pro- und antiangiogenen Substanzen aus Thrombozyten freigesetzt werden, muss in Zukunft näher erforscht werden.

Unsere Beobachtungen sind von klinischer Relevanz, denn die pharmakologische Modulation der Angiogenese ist nicht nur bei Krebserkrankungen ein vielversprechendes therapeutisches Prinzip. Bei der Bekämpfung von Tumoren steht die Hemmung der Angiogenese im Vordergrund, da das Tumorwachstum dadurch unterbunden werden soll, dass die neoplastischen Zellen ihren Energie- und Sauerstoffbedarf nicht mehr decken können, wenn die Angiogenese mit dem Tumorwachstum nicht Schritt hält. Bei kardiovaskulären Erkrankungen steht im

4. Diskussion

Allgemein die Steigerung der Angiogenese im Vordergrund (Carmeliet, 2005; Korf-Klingebiel et al., 2015). Wenn Gewebe aufgrund eines Gefäßverschlusses oder einer chronischen Gefäßverengung geschädigt wird, hängt das Ausmaß der resultierenden Ischämie und damit das Ausmaß des entstehenden Schadens davon ab, wie schnell durch Induktion von Angiogenese die Versorgung des Gewebes wiederhergestellt werden kann (Mitsos et al., 2012). Dies ist von großer klinischer Bedeutung, da beispielweise die Koronare Herzerkrankung und die daraus resultierende ischämische Kardiomyopathie für Millionen Todesfälle weltweit verantwortlich ist und weiterhin eine der Haupttodesursachen in den entwickelten Ländern darstellt (Murray and Lopez, 1997). Seit über 10 Jahren werden daher klinische Studien zur proangiogenen Therapie bei kardiovaskulären Erkrankungen durchgeführt. Diese haben allerdings zuletzt gemischte Ergebnisse geliefert. Aufgrund einer Reihe von Schwierigkeiten ist es weiterhin unklar, wie therapeutische Angiogenese sicher und effektiv induziert werden kann (Mitsos et al., 2012). Wenn dies aber gelänge, könnte das einen maßgeblichen Durchbruch bei der Therapie der Koronaren Herzerkrankung darstellen (Mitsos et al., 2012). Ein gentherapeutischer Ansatz hat diesbezüglich bereits positive Ergebnisse geliefert. Mittels der Anwendung von AdVEGF₁₂₁ bei Patienten mit nicht interventionell behandelbarer Koronarer Herzerkrankung zeigte sich eine objektive Verbesserung bei belastungsinduzierter Ischämie nach 26 Wochen (Stewart et al., 2006). Auch mittels Applikation von rekombinantem VEGF konnte eine Verbesserung der Angina pectoris-Beschwerden von KHK-Patienten erreicht werden (Henry et al., 2003). Eine Modulation der Angiogenese durch Thrombozyten ist auch insofern im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen von großer Bedeutung, weil es ein anerkanntes Therapiekonzept darstellt, die Funktion von Thrombozyten bei diesen Erkrankungen zu hemmen (Dütting et al., 2012). Welche Effekte dies auf die möglicherweise protektive Angiogenese in vivo ausübt, sollte in Zukunft untersucht werden.

Auch die Modulation des Komplementsystems ist in therapeutischer Hinsicht von großer Bedeutung. Komplementinhibitoren wurden bereits als neue Medikamente beispielsweise bei der altersbedingten Makuladegeneration zugelassen und werden in einer großen Zahl weiterer Felder erprobt (Ricklin and Lambris,

4. Diskussion

2007). Auch bei thrombotischen Erkrankungen wie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie sind Komplementmodulatoren als Therapeutika etabliert (Brodsky et al., 2006; Kelly et al., 2015), des Weiteren beim hämolytisch-urämischem Syndrom (Noris et al., 2012). Aktuelle Studien untersuchen den Nutzen von Komplementmodulatoren bei Arthritis (Murayama et al., 2015), Sepsis (Rittirsch et al., 2008), dem Ischämie-Reperfusionssyndrom (Pavlov et al., 2012; Schwaeble et al., 2011), zur Prävention der Schädigung des Fötus bei Antiphospholipidsyndrom (Girardi et al., 2003) oder beim abdominellen Aortenaneurysma (Zhou et al., 2012, 2013). Diese Arbeit legt nahe, dass sich mittels Inhibitoren der C5a-C5aR-Achse bei ischämischen Erkrankungen über den auf Thrombozyten exprimierten Rezeptor das angiogene Gleichgewicht hin zur Stimulation der Angiogenese verschieben ließe.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit also eine Verbindung her zwischen den bereits beschriebenen antiangiogenen Effekten von Thrombozyten (Zaslavsky et al., 2010) sowie der antiangiogenen Rolle des Komplementsystems (Langer et al., 2010). Dies unterstreicht die Rolle von Thrombozyten und des Komplementsystems bei der Modulation der Angiogenese und eröffnet hierdurch potentiell neue therapeutische Ansätze zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Seit einigen Jahren gibt es Hinweise, dass Thrombozyten an der Modulation der Blutgefäßneubildung, der Angiogenese, beteiligt sind. Bisher wurden allerdings erst wenige Mechanismen beschrieben, über die eine solche Modulation vermittelt wird. Diese Arbeit identifiziert den auf Thrombozyten exprimierten C5a-Komplementrezeptor als einen wichtigen Mediator Thrombozyten-vermittelter Effekte sowohl auf zentrale Endothelzellfunktionen als auch der wachstumsfaktorvermittelten und hypoxiegetriggerten Angiogenese *in vivo*.

Diese Arbeit zeigt im Matrigelplug-Assay, dass Thrombozyten wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese inhibieren können. Außerdem konnten wir zeigen, dass Thrombozyten den C5a-Rezeptor exprimieren und dessen Expression nach Stimulation mit verschiedenen Plättchenaktivatoren modulieren. Die C5aR-Expression auf Thrombozyten nimmt zu, wenn diese mit Kollagen aktiviert werden, und auch bei Kontakt mit oxLDL, was die Bedeutung der Ergebnisse im Kontext der Atherosklerose hervorhebt. Wir konnten darüber hinaus C5aR-exprimierende Thrombozyten im ischämischen, also angiogen aktiven, Gewebe nachweisen. Die Koinkubation von Thrombozyten und Endothelzellen *in vitro* zeigte, dass der thrombozytäre C5a-Rezeptor keinen Einfluss auf die endotheliale Proliferation ausübt, die Migration und Tube formation von Endothelzellen allerdings inhibiert.

Passend dazu zeigte sich *in vivo*, dass C5aR-Knockout-Mäuse ein erhöhtes Niveau an wachstumsfaktorinduzierter und hypoxiegetriggelter Angiogenese aufweisen. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt nicht mehr signifikant nachweisen, wenn Thrombozyten systemisch depletiert wurden. Dies weist auf einen bedeutsamen Beitrag des thrombozytären C5a-Komplementrezeptors bei Steuerung der Angiogenese *in vivo* hin. Das wird dadurch unterstrichen, dass wir zeigen konnten, dass die Retransfusion von Thrombozyten mit intaktem C5a-Rezeptor in C5aR-Knockout-Tiere deren erhöhtes Angiogeneseniveau im Matrigelplug-Assay teilweise normalisiert.

5. Zusammenfassung

Schließlich konnten wir demonstrieren, dass bereits der Überstand von C5a-stimulierten Thrombozyten *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf die endotheliale Migration und Tube formation vermittelt. Mittels Proteome profiling konnten wir den bekanntermaßen antiangiogenen Faktor PF4 als einen wichtigen für diesen Effekt verantwortlichen Faktor identifizieren. Nach C5a-Stimulation setzen Thrombozyten PF4 frei. Wird PF4 *in vivo* inhibiert, so lässt sich das Angiogeneseniveau von C5aR-Knockout-Tieren mittels Retransfusion von WT-Thrombozyten im Matrigelplug-Assay nicht mehr signifikant senken. Dieser Mechanismus trägt also auch *in vivo* maßgeblich zur thrombozytenvermittelten Inhibition der Angiogenese bei.

Zusammenfassend führt C5a mittels des thrombozytären C5a-Rezeptors zur Freisetzung von PF4 aus Thrombozyten. Thrombozyten üben so einen antiangiogenen Einfluss aus. Diese Arbeit beschreibt also einen konkreten Mechanismus, wie Thrombozyten die Angiogenese steuern und beschreibt einen neuen Überschneidungspunkt des Komplementsystems, des Hämostasesystems und der Angiogenese. Diese drei Systeme sind bei zahlreichen Pathologien von großer Bedeutung und ihr Zusammenspiel noch unvollständig verstanden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse könnten daher auch für das Verständnis und die Therapie der Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen in Zukunft förderlich sein.

6 LITERATUR

- Aidoudi-Ahmed, S., and A. Bikfalvi. 2010. Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: A role in atherosclerosis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 104:941–948. doi:10.1160/TH10-03-0193.
- Alawieh, A., A. Elvington, and S. Tomlinson. 2015. Complement in the Homeostatic and Ischemic Brain. *Front. Immunol.* 6:417. doi:10.3389/fimmu.2015.00417.
- Amara, U., D. Rittirsch, M. Flierl, U. Bruckner, A. Klos, F. Gebhard, J.D. Lambris, and M. Huber-Lang. 2008. Interaction Between the Coagulation and Complement System. *In* Advances in experimental medicine and biology. 68–76.
- Amsterdam, E.A., N.K. Wenger, R.G. Brindis, D.E. Casey, T.G. Ganiats, D.R. Holmes, A.S. Jaffe, H. Jneid, R.F. Kelly, and M.C. Kontos. 2014. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non–ST-elevation acute coronary syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64:e139–e228.
- Andrews, R.K., M.C. Berndt, and J.A. López. 2007. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *In* Platelets. A. Michelson, editor. Elsevier, San Diego. 145–163.
- Battinelli, E.M., B.A. Markens, and J.E. Italiano. 2011. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: Modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood.* 118:1359–1369. doi:10.1182/blood-2011-02-334524.
- Becker, S., U. Hadding, H.U. Schorlemmer, and D. Bitter-Suermann. 1978. Demonstration of high-affinity binding sites for C3a anaphylatoxin on guinea-pig platelets. *Scand. J. Immunol.* 8:551–555.
- Benton, G., I. Arnaoutova, J. George, H.K. Kleinman, and J. Koblinski. 2014. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 79:3–18.
- Bergmann, C.E., I.E. Hoefer, B. Meder, H. Roth, N. van Royen, S.M. Breit, M.M. Jost, S. Aharinejad, S. Hartmann, and I.R. Buschmann. 2006. Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J. Leukoc. Biol.* 80:59–65.
- Bergmeier, W., C.L. Piffath, T. Goerge, S.M. Cifuni, Z.M. Ruggeri, J. Ware, and D.D. Wagner. 2006. The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:16900–5. doi:10.1073/pnas.0608207103.
- Bergmeier, W., and L. Stefanini. 2013. Platelet ITAM signaling. *Curr. Opin. Hematol.* 20:445–50. doi:10.1097/MOH.0b013e3283642267.
- Berndt, M.C., P. Metharom, and R.K. Andrews. 2014. Primary haemostasis: Newer insights. *Haemophilia.* 20:15–22. doi:10.1111/hae.12427.

6. Literatur

- Blair, P., and R. Flaumenhaft. 2009. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23:177–189. doi:10.1016/j.blre.2009.04.001.
- Bora, P.S., J.-H. Sohn, J.M.C. Cruz, P. Jha, H. Nishihori, Y. Wang, S. Kaliappan, H.J. Kaplan, and N.S. Bora. 2005. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J. Immunol.* 174:491–7. doi:10.4049/jimmunol.174.1.491.
- Brennan, F.H., R. Gordon, H.W. Lao, P.J. Biggins, S.M. Taylor, R.J.M. Franklin, T.M. Woodruff, and M.J. Ruitenber. 2015. The Complement Receptor C5aR Controls Acute Inflammation and Astroglialosis following Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 35:6517–6531. doi:10.1523/JNEUROSCI.5218-14.2015.
- Brill, A., H. Elinav, and D. Varon. 2004. Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 63:226–235. doi:10.1016/j.cardiores.2004.04.012.
- Brodsky, R.A., G. Socié, D. Ph, P. Muus, D. Ph, A. Röth, J. Szer, M.O. Elebute, R. Nakamura, P. Browne, A.M. Risitano, D. Ph, A. Hill, B. Ch, H. Schrezenmeier, C. Fu, J. Maciejewski, D. Ph, S.A. Rollins, D. Ph, C.F. Mojciak, D. Ph, R.P. Rother, D. Ph, and L. Luzzatto. 2006. The Complement Inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 355:1233–1243.
- Cao, Y., J. Arbiser, R.J. D'Amato, P. a. D'Amore, D.E. Ingber, R. Kerbel, M. Klagsbrun, S. Lim, M. a. Moses, B. Zetter, H. Dvorak, and R. Langer. 2011. Forty-Year Journey of Angiogenesis Translational Research. *Sci. Transl. Med.* 3:114rv3-114rv3. doi:10.1126/scitranslmed.3003149.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 438:932–936. doi:10.1038/nature04478.
- Chatterjee, M., Z. Huang, W. Zhang, L. Jiang, K. Hultenby, L. Zhu, H. Hu, G.P. Nilsson, and N. Li. 2011. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood.* 117:3907–3911. doi:10.1182/blood-2010-12-327007.
- Choi, E.Y., E. Chavakis, M.A. Czabanka, H.F. Langer, L. Fraemohs, M. Economopoulou, R.K. Kundu, A. Orlandi, Y.Y.Y. Zheng, D.A. Prieto, C.M. Ballantyne, S.L. Constant, W.C. Aird, T. Papayannopoulou, C.G. Gahmberg, M.C. Udey, P. Vajkoczy, T. Quertermous, S. Dimmeler, C. Weber, and T. Chavakis. 2008. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science (80-.).* 322:1101–1104. doi:10.1126/science.1165218.
- Conroy, A., L. Serghides, C. Finney, S.O. Owino, S. Kumar, D.C. Gowda, W.C. Liles, J.M. Moore, and K.C. Kain. 2009. C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria In Vitro: Potential Implications for Placental Malaria. *PLoS One.* 4:e4953. doi:10.1371/journal.pone.0004953.
- Corthay, A. 2014. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front. Immunol.* 5:197.

6. Literatur

- Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*. 438:937–945.
- Csaky, K.G., P.U. Dugel, A.J. Pierce, M.A. Fries, D.S. Kelly, R.P. Danis, J.I. Wurzelmann, C.-F. Xu, M. Hossain, and T. Trivedi. 2015. Clinical evaluation of pazopanib eye drops versus ranibizumab intravitreal injections in subjects with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 122:579–588.
- Daub, K., P. Seizer, K. Stellos, B.F. Krämer, B. Bigalke, M. Schaller, S. Fateh-Moghadam, M. Gawaz, and S. Lindemann. 2010. Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation. *Semin. Thromb. Hemost.* 36:146–156. doi:10.1055/s-0030-1251498.
- Do, D. V., D.J. Pieramici, M. van Lookeren Campagne, T. Beres, M. Friesenhahn, Y. Zhang, and E.C. Strauss. 2014. A Phase Ia Dose-Escalation Study of the Anti-Factor D Monoclonal Antibody Fragment Fcd4514S in Patients With Geographic Atrophy. *Retina*. 34:313–320. doi:10.1097/IAE.0b013e3182979ddd.
- Dütting, S., M. Bender, and B. Nieswandt. 2012. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol. Sci.* 33:583–590.
- Eslin, D.E., C. Zhang, K.J. Samuels, L. Rauova, L. Zhai, S. Niewiarowski, D.B. Cines, M. Poncz, and M.A. Kowalska. 2004. Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: Dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. *Blood*. 104:3173–3180. doi:10.1182/blood-2003-11-3994.
- Etulain, J., S. Negrotto, M.V. Tribulatti, D.O. Croci, J. Carabelli, O. Campetella, G.A. Rabinovich, and M. Schattner. 2014. Control of angiogenesis by galectins involves the release of platelet-derived proangiogenic factors. *PLoS One*. 9:e96402. doi:10.1371/journal.pone.0096402.
- Etulain, J., and M. Schattner. 2014. Glycobiology of platelet-endothelial cell interactions. *Glycobiology*. 24:1252–1259. doi:10.1093/glycob/cwu056.
- Europäische Gesundheitsbericht 2012. 2015.
- Feng, W., M. Madajka, B.A. Kerr, G.H. Mahabeleshwar, S.W. Whiteheart, and T. V Byzova. 2011. A novel role for platelet secretion in angiogenesis: mediating bone marrow-derived cell mobilization and homing. *Blood*. 117:3893 LP-3902.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285:1182–1186.
- Folkmann, J., and C. Haudenschild. 1980. Angiogenesis in Vitro. *Nature*. 288:551–556. doi:10.1038/288551a0.
- Fukuoka, Y., and T.E. Hugli. 1988. Demonstration of a specific C3a receptor on guinea pig platelets. *J. Immunol.* 140:3496–3501.
- Gaengel, K., and C. Betsholtz. 2013. Endocytosis regulates VEGF signalling during angiogenesis. *Nat. Cell Biol.* 15:233–235. doi:10.1038/ncb2705.

6. Literatur

- Galkina, E., and K. Ley. 2009. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27:165–197. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132620.
- Gao, H., T. a Neff, R.-F. Guo, C.L. Speyer, J.V. Sarma, S. Tomlins, Y. Man, N.C. Riedemann, L.M. Hoesel, E. Younkin, F.S. Zetoune, and P. a Ward. 2005. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J.* 19:1003–5. doi:10.1096/fj.04-3424fje.
- Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May. 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 115:3378–3384. doi:10.1172/JCI27196.
- Gawaz, M.P., J.C. Loftus, M.L. Bajt, M.M. Frojmovic, E.F. Plow, and M.H. Ginsberg. 1991. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J. Clin. Invest.* 88:1128–1134. doi:10.1172/JCI115412.
- Girardi, G., J. Berman, P. Redecha, L. Spruce, J.M. Thurman, D. Kraus, T.J. Hollmann, P. Casali, M.C. Carroll, R.A. Wetsel, J.D. Lambris, V.M. Holers, and J.E. Salmon. 2003. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J. Clin. Invest.* 112:1644–1654. doi:10.1172/JCI200318817.
- Girardi, G., P. Redecha, and J.E. Salmon. 2004. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat. Med.* 10:1222–1226. doi:10.1038/nm1121.
- Girardi, G., D. Yarilin, J.M. Thurman, V.M. Holers, and J.E. Salmon. 2006. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med.* 203:2165–2175. doi:10.1084/jem.20061022.
- Givan, A.L. 2001. Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol.* 63:19–50.
- Godau, J., T. Heller, H. Hawlisch, M. Trappe, E. Howells, J. Best, J. Zwirner, J.S. Verbeek, P.M. Hogarth, C. Gerard, N. van Rooijen, A. Klos, J.E. Gessner, and J. Kohl. 2004. C5a Initiates the Inflammatory Cascade in Immune Complex Peritonitis. *J. Immunol.* 173:3437–3445. doi:10.4049/jimmunol.173.5.3437.
- Golebiewska, E.M., and A.W. Poole. 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29:153–162. doi:10.1016/j.blre.2014.10.003.
- Grossklaus, C.H.R., B. Damerau, E. Lemgo, and W. Vogt. 1976. Induction of platelet aggregation by the complement-derived peptides C3a and C5a. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 295:71–76.
- Guo, D., Q. Jia, H.Y. Song, R.S. Warren, and D.B. Donner. 1995. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 270:6729–33.
- Hagedorn, I., T. Vögtle, and B. Nieswandt. 2010. Arterial thrombus formation.

6. Literatur

- Novel mechanisms and targets Novel mechanisms and targets. *Hamostaseologie*. 30:127–35.
- Hartwig, H., M. Drechsler, D. Lievens, B. Kramp, P. von Hundelshausen, E. Lutgens, C. Weber, Y. Döring, and O. Soehnlein. 2013. Platelet-derived PF4 reduces neutrophil apoptosis following arterial occlusion. *Thromb. Haemost.* 111:562–564. doi:10.1160/TH13-08-0699.
- Haviland, D.L., R.L. McCoy, W.T. Whitehead, H. Akama, E.P. Molmenti, A. Brown, J.C. Haviland, W.C. Parks, D.H. Perlmutter, and R.A. Wetsel. 1995. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J. Immunol.* 154:1861–9.
- Hearse, D.J., and R. Bolli. 1992. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc. Res.* 26:101–8. doi:10.1093/cvrese/26.2.101.
- Henry, T.D., B.H. Annex, G.R. McKendall, M.A. Azrin, J.J. Lopez, F.J. Giordano, P.K. Shah, J.T. Willerson, R.L. Benza, D.S. Berman, C.M. Gibson, A. Bajamonde, A.C. Rundle, J. Fine, and E.R. McCluskey. 2003. The VIVA Trial. *Circulation*. 107:1359–1365.
- Hicklin, D.J., and L.M. Ellis. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 23:1011–1027. doi:10.1200/JCO.2005.06.081.
- Hirota, K., and G.L. Semenza. 2006. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 59:15–26. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.12.003.
- Hochman, J.S., L.A. Sleeper, J.G. Webb, V. Dzavik, C.E. Buller, P. Aylward, J. Col, H.D. White, and for the SHOCK Investigators. 2006. Early Revascularization and Long-term Survival in Cardiogenic Shock Complicating Acute Myocardial Infarction. *JAMA*. 295:2511. doi:10.1001/jama.295.21.2511.
- Hopken, U., B. Lu, N. Gerard, and C. Gerard. 1996. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature*. 383:86–89. doi:10.1038/383086a0.
- Huang, J.S., S.K. Ramamurthy, X. Lin, and G.C. Le Breton. 2004. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell. Signal.* 16:521–533. doi:10.1016/j.cellsig.2003.10.008.
- Huo, Y., A. Schober, S.B. Forlow, D.F. Smith, M.C. Hyman, S. Jung, D.R. Littman, C. Weber, and K. Ley. 2003. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* 9:61–67. doi:10.1038/nm810.
- Italiano, J.E., J.L. Richardson, S. Patel-Hett, E. Battinelli, A. Zaslavsky, S. Short, S. Ryeom, J. Folkman, and G.L. Klement. 2008. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: Pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. *Blood*. 111:1227–

6. Literatur

1233. doi:10.1182/blood-2007-09-113837.
- Itoh, N., and D.M. Ornitz. 2011. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* 149:121–130. doi:10.1093/jb/mvq121.
- Jackson, S.P. 2011. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nat. Med.* 17:1423–1436. doi:10.1038/nm.2515.
- Jin, J., J.L. Daniel, and S.P. Kunapuli. 1998. Molecular basis for ADP-induced platelet activation: II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J. Biol. Chem.* 273:2030–2034. doi:10.1074/jbc.273.4.2030.
- Kahr, W.H.A. 2010. Complement halts angiogenesis gone wild. *Blood.* 116:4393–4394. doi:10.1182/blood-2010-08-297648.
- Kelly, R.J., B. Höchsmann, J. Szer, A. Kulasekararaj, S. de Guibert, A. Röth, I.C. Weitz, E. Armstrong, A.M. Risitano, C.J. Patriquin, L. Terriou, P. Muus, A. Hill, M.P. Turner, H. Schrezenmeier, and R. Peffault de Latour. 2015. Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 373:1032–1039. doi:10.1056/NEJMoa1502950.
- Kisucka, J., C.E. Butterfield, D.G. Duda, S.C. Eichenberger, S. Saffaripour, J. Ware, Z.M. Ruggeri, R.K. Jain, J. Folkman, and D.D. Wagner. 2006. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:855–60. doi:10.1073/pnas.0510412103.
- Klement, G.L., T.T. Yip, F. Cassiola, L. Kikuchi, D. Cervi, V. Podust, J.E. Italiano, E. Wheatley, A. Abou-Slaybi, E. Bender, N. Almog, M.W. Kieran, and J. Folkman. 2009. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood.* 113:2835–2842. doi:10.1182/blood-2008-06-159541.
- Knighton, D.R., T.K. Hunt, K.K. Thakral, and W.H. Goodson. 1982. Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann. Surg.* 196:379–88. doi:10.1097/00000658-198210000-00001.
- Koenen, R.R., P. von Hundelshausen, I. V Nesmelova, A. Zerneck, E.A. Liehn, A. Sarabi, B.K. Kramp, A.M. Piccinini, S.R. Paludan, M.A. Kowalska, A.J. Kungl, T.M. Hackeng, K.H. Mayo, and C. Weber. 2009. Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat. Med.* 15:97–103. doi:10.1038/nm.1898.
- Korf-Klingebiel, M., M.R. Reboll, S. Klede, T. Brod, A. Pich, F. Polten, L.C. Napp, J. Bauersachs, A. Ganser, E. Brinkmann, I. Reimann, T. Kempf, H.W. Niessen, J. Mizrahi, H.-J. Schönfeld, A. Iglesias, M. Bobadilla, Y. Wang, and K.C. Wollert. 2015. Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat. Med.* 21:140–149. doi:10.1038/nm.3778.
- Lambris, J.D., D. Ricklin, and B. V. Geisbrecht. 2008. Complement evasion by

6. Literatur

- human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:132–142. doi:10.1038/nrmicro1824.
- Lammert, E., and J. Axnick. 2012. Vascular lumen formation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2:a006619. doi:10.1101/cshperspect.a006619.
- Langer, H., A.E. May, K. Daub, U. Heinzmann, P. Lang, M. Schumm, D. Vestweber, S. Massberg, T. Schönberger, I. Pfisterer, A.K. Hatzopoulos, and M. Gawaz. 2006. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ. Res.* 98:e2–e10. doi:10.1161/01.RES.0000201285.87524.9e.
- Langer, H.F., and T. Chavakis. 2009. Leukocyte–endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* 13:1211–1220.
- Langer, H.F., E.Y. Choi, H. Zhou, R. Schleicher, K.-J. Chung, Z. Tang, K. Gobel, K. Bdeir, A. Chatzigeorgiou, C. Wong, S. Bhatia, M.J. Kruhlak, J.W. Rose, J.B. Burns, K.E. Hill, H. Qu, Y. Zhang, E. Lehrmann, K.G. Becker, Y. Wang, D.I. Simon, B. Nieswandt, J.D. Lambris, X. Li, S.G. Meuth, P. Kubes, and T. Chavakis. 2012. Platelets Contribute to the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Circ. Res.* 110:1202–1210. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.256370.
- Langer, H.F., K.-J. Chung, V. V. Orlova, E.Y. Choi, S. Kaul, M.J. Kruhlak, M. Alatsatianos, R.A. DeAngelis, P.A. Roche, P. Magotti, X. Li, M. Economopoulou, S. Rafail, J.D. Lambris, and T. Chavakis. 2010. Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood.* 116:4395–4403. doi:10.1182/blood-2010-01-261503.
- Leclère, F.M., L. Mathys, B. Juon, T. Franz, F. Unglaub, and E. Vögelin. 2012. Macroreplantations of the upper extremity: a series of 11 patients. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 132:1797–1805. doi:10.1007/s00402-012-1590-8.
- Leslie, M. 2012. The New View of Complement. *Science (80-)*. 337:1034–1037. doi:10.1126/science.337.6098.1034.
- Levy, A.P., N.S. Levy, S. Wegner, and M.A. Goldberg. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270:13333–13340.
- Li, G., R.-M. Fan, J.-L. Chen, C.-M. Wang, Y.-C. Zeng, C. Han, S. Jiao, X.-P. Xia, W. Chen, and S.-T. Yao. 2014. Neuroprotective effects of argatroban and C5a receptor antagonist (PMX53) following intracerebral haemorrhage. *Clin. Exp. Immunol.* 175:285–95. doi:10.1111/cei.12220.
- Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson. 2009. Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54:2129–2138. doi:10.1016/j.jacc.2009.09.009.
- Libby, P., and P. Theroux. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 111:3481–3488. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878.
- Lim, Y., and F.W. Lusinskas. 2006. Isolation and Culture of Murine Heart and Lung Endothelial Cells for In Vitro Model Systems. *Methods Mol. Biol.*

6. Literatur

- 341:141–154. doi:10.1385/1-59745-113-4:141.
- Limbourg, A., T. Korff, L.C. Napp, W. Schaper, H. Drexler, and F.P. Limbourg. 2009. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat. Protoc.* 4:1737–46. doi:10.1038/nprot.2009.185.
- Limbourg, A., M. Ploom, D. Elligsen, I. Sørensen, T. Ziegelhoeffer, A. Gossler, H. Drexler, and F.P. Limbourg. 2007. Notch Ligand Delta-Like 1 Is Essential for Postnatal Arteriogenesis. *Circ. Res.* 100:363 LP-371.
- Lindahl, T. 1974. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71:3649–3653.
- Lindemann, S., N.D. Tolley, D.A. Dixon, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and A.S. Weyrich. 2001. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *J. Cell Biol.* 154:485–490. doi:10.1083/jcb.200105058.
- van Lookeren Campagne, M., E.C. Strauss, and B.L. Yaspan. 2015. Age-related macular degeneration: Complement in action. *Immunobiology.* 221:733–739. doi:10.1016/j.imbio.2015.11.007.
- Ma, L., R. Perini, W. McKnight, M. Dickey, A. Klein, M.D. Hollenberg, and J.L. Wallace. 2005. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:216–220. doi:10.1073/pnas.0406682102.
- Markiewski, M.M., and J.D. Lambris. 2007. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am. J. Pathol.* 171:715–27. doi:10.2353/ajpath.2007.070166.
- Martel, C., S. Cointe, P. Maurice, S. Matar, M. Ghitescu, P. Thérout, and A. Bonnefoy. 2011. Requirements for Membrane Attack Complex Formation and Anaphylatoxins Binding to Collagen-Activated Platelets. *PLoS One.* 6:e18812. doi:10.1371/journal.pone.0018812.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, and M. Gawaz. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* 196:887–896. doi:10.1084/jem.20012044.
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlnhöfer, U. Heinzmann, and B. Nieswandt. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J. Exp. Med.* 197:41–49. doi:10.1084/jem.20020945.
- Maurer, A.-M., B. Zhou, and Z.C. Han. 2006. Roles of platelet factor 4 in hematopoiesis and angiogenesis. *Growth Factors.* 24:242–52. doi:10.1080/08977190600988225.
- Mause, S.F., and C. Weber. 2010. Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* 107:1047–1057. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226456.

6. Literatur

- Meuer, S., U. Ecker, U. Hadding, and D. Bitter-Suermann. 1981. Platelet-serotonin release by C3a and C5a: two independent pathways of activation. *J. Immunol.* 126:1506–1509.
- Michelson, A.D., M.R. Barnard, L.A. Krueger, C.R. Valeri, and M.I. Furman. 2001. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* 104:1533–7. doi:10.1161/hc3801.095588.
- Mitsos, S., K. Katsanos, E. Koletsis, G.C. Kagadis, N. Anastasiou, A. Diamantopoulos, D. Karnabatidis, and D. Dougenis. 2012. Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: Basic biological concepts and focus on latest clinical trials. *Angiogenesis.* 15:1–22. doi:10.1007/s10456-011-9240-2.
- Moreira, D.M., R.L. da Silva, J.L. Vieira, T. Fattah, M.E. Lueneberg, and C.A.M. Gottschall. 2015. Role of Vascular Inflammation in Coronary Artery Disease: Potential of Anti-inflammatory Drugs in the Prevention of Atherothrombosis. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 15:1–11. doi:10.1007/s40256-014-0094-z.
- Moroi, M., and S.M. Jung. 2004. Platelet glycoprotein VI: Its structure and function. *Thromb. Res.* 114:221–233. doi:10.1016/j.thromres.2004.06.046.
- Munnix, I.C.A., M.J.E. Kuijpers, J. Auger, C.M.L.G.D. Thomassen, P. Panizzi, M.A.M. Van Zandvoort, J. Rosing, P.E. Bock, S.P. Watson, and J.W.M. Heemskerk. 2007. Segregation of platelet aggregatory and procoagulant microdomains in thrombus formation: Regulation by transient integrin activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:2484–2490. doi:10.1161/ATVBAHA.107.151100.
- Murayama, M.A., S. Kakuta, A. Inoue, N. Umeda, T. Yonezawa, T. Maruhashi, K. Tateishi, H. Ishigame, R. Yabe, S. Ikeda, A. Seno, H.H. Chi, Y. Hashiguchi, R. Kurata, T. Tada, S. Kubo, N. Sato, Y. Liu, M. Hattori, S. Saijo, M. Matsushita, T. Fujita, T. Sumida, and Y. Iwakura. 2015. CTRP6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis. *Nat Commun.* 6:8483. doi:10.1038/ncomms9483.
- Murray, C.J., and A.D. Lopez. 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 349:1269–1276. doi:10.1016/S0140-6736(96)07493-4.
- Naik, U.P., and M.U. Naik. 2003. Association of CIB with GPIIb/IIIa during outside-in signaling is required for platelet spreading on fibrinogen. *Blood.* 102:1355–1362. doi:10.1182/blood-2003-02-0591.
- Nieswandt, B., I. Pleines, and M. Bender. 2011. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J. Thromb. Haemost.* 9:92–104. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04100.x.
- Nieswandt, B., D. Varga-Szabo, and M. Elvers. 2009. Integrins in platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* 7:206–209. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03370.x.

6. Literatur

- Nording, H., A. Giesser, J. Patzelt, R. Sauter, F. Emschermann, K. Stellos, M. Gawaz, and H.F. Langer. 2016. Platelet bound oxLDL shows an inverse correlation with plasma anaphylatoxin C5a in patients with coronary artery disease. *Platelets*. 7104:1–5. doi:10.3109/09537104.2016.1148807.
- Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer. 2015. Platelets in Inflammation and Atherogenesis. *Front. Immunol.* 6:98. doi:10.3389/fimmu.2015.00098.
- Noris, M., F. Mescia, and G. Remuzzi. 2012. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat. Rev. Nephrol.* 8:622–33. doi:10.1038/nrneph.2012.195.
- Nozaki, M., B.J. Raisler, E. Sakurai, J.V. Sarma, S.R. Barnum, J.D. Lambris, Y. Chen, K. Zhang, B.K. Ambati, and J.Z. Baffi. 2006. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:2328–2333.
- Offermanns, S. 2006. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 99:1293–1304. doi:10.1161/01.RES.0000251742.71301.16.
- Ozaki, Y., N. Asazuma, K. SUZUKI-INOUE, and M.C. Berndt. 2005. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *J. Thromb. Haemost.* 3:1745–1751.
- Packham, I.M., S.P. Watson, R. Bicknell, and S. Egginton. 2014. In vivo evidence for platelet-induced physiological angiogenesis by a COX driven mechanism. *PLoS One*. 9:e107503. doi:10.1371/journal.pone.0107503.
- Patzelt, J., and H.F. Langer. 2012. Platelets in angiogenesis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10:570–577. doi:10.2174/157016112801784648.
- Patzelt, J., K.A.L. Mueller, S. Breuning, A. Karathanos, R. Schleicher, P. Seizer, M. Gawaz, H.F. Langer, and T. Geisler. 2015a. Expression of anaphylatoxin receptors on platelets in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 238:289–295. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.002.
- Patzelt, J., A. Verschoor, and H.F. Langer. 2015b. Platelets and the complement cascade in atherosclerosis. *Front. Physiol.* 6:1–9. doi:10.3389/fphys.2015.00049.
- Pavlov, V.I., M.O. Skjoedt, Y.S. Tan, A. Rosbjerg, P. Garred, and G.L. Stahl. 2012. Endogenous and natural complement inhibitor attenuates myocardial injury and arterial thrombogenesis. *Circulation*. 126:2227–2235. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123968.
- Phieler, J., K.-J. Chung, A. Chatzigeorgiou, A. Klotzsche-von Ameln, R. Garcia-Martin, D. Sprott, M. Moisidou, T. Tzanavari, B. Ludwig, and E. Baraban. 2013. The complement anaphylatoxin C5a receptor contributes to obese adipose tissue inflammation and insulin resistance. *J. Immunol.* 191:4367–4374.
- Polley, M.J., and R. Nachman. 1978. The human complement system in thrombin-mediated platelet function. *J. Exp. Med.* 147:1713–1726. doi:10.1084/jem.147.6.1713.
- Radziwon-Balicka, A., C. Moncada de la Rosa, B. Zielnik, A. Doroszko, and P.

6. Literatur

- Jurasz. 2013. Temporal and Pharmacological Characterization of Angiostatin Release and Generation by Human Platelets: Implications for Endothelial Cell Migration. *PLoS One*. 8. doi:10.1371/journal.pone.0059281.
- Rafail, S., I. Kourtzelis, P.G. Foukas, M.M. Markiewski, R.A. DeAngelis, M. Guariento, D. Ricklin, E.A. Grice, and J.D. Lambris. 2015. Complement Deficiency Promotes Cutaneous Wound Healing in Mice. *J. Immunol.* 194:1285–1291. doi:10.4049/jimmunol.1402354.
- Rendu, F., and B. Brohard-Bohn. 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 12:261–273. doi:10.1080/09537100120068170.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, and J.D. Lambris. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11:785–97. doi:10.1038/ni.1923.
- Ricklin, D., and J.D. Lambris. 2007. Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 25:1265–1275. doi:10.1038/nbt1342.
- Ricklin, D., and J.D. Lambris. 2013. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J. Immunol.* 190:3831–3838. doi:10.4049/jimmunol.1203487.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386:671–674.
- Risau, W., and I. Flamme. 1995. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:73–91.
- Rittirsch, D., M.A. Flierl, B. Nadeau, D.E. Day, M. Huber-Lang, C.R. Mackay, F.S. Zetoune, N.P. Gerard, K. Cianflone, J. Köhl, C. Gerard, J.V. Sarma, and P.A. Ward. 2008. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat. Med.* 14:551–557. doi:10.1038/nm1753.
- Ross, R., J. Glomset, B. Kariya, and L. Harker. 1974. A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71:1207–1210. doi:10.1073/pnas.71.4.1207.
- Röth, A., C. Hock, A. Konik, S. Christoph, and U. Dührsen. 2011. Chronic treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients with eculizumab: Safety, efficacy, and unexpected laboratory phenomena. *Int. J. Hematol.* 93:704–714. doi:10.1007/s12185-011-0867-y.
- Ruggeri, Z.M., A. Zarpellon, J.R. Roberts, R.A. Mc Clintock, H. Jing, and G.L. Mendolicchio. 2010. Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* 104:894.
- Rutkowski, M.J., M.E. Sughrue, A.J. Kane, S.A. Mills, and A.T. Parsa. 2010. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res.* 8:1453–1465. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0225.
- Schirmer, S.H., F.C. van Nooijen, J.J. Piek, and N. van Royen. 2008. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart*. 95:191–197. doi:10.1136/hrt.2007.136119.

6. Literatur

- Schleicher, R.I., F. Reichenbach, P. Kraft, A. Kumar, M. Lescan, F. Todt, K. G??bel, I. Hilgendorf, T. Geisler, A. Bauer, M. Olbrich, M. Schaller, S. Wesselborg, L. O'Reilly, S.G. Meuth, K. Schulze-Osthoff, M. Gawaz, X. Li, C. Kleinschnitz, F. Edlich, and H.F. Langer. 2015. Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL. *Blood*. 126:1483–1493. doi:10.1182/blood-2013-12-544445.
- Schwaeble, W.J., N.J. Lynch, J.E. Clark, M. Marber, N.J. Samani, Y.M. Ali, T. Dudler, B. Parent, K. Lhotta, R. Wallis, C.A. Farrar, S. Sacks, H. Lee, M. Zhang, D. Iwaki, M. Takahashi, T. Fujita, C.E. Tedford, and C.M. Stover. 2011. Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:7523–8. doi:10.1073/pnas.1101748108.
- Semenza, G.L. 2001. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* 7:345–350. doi:10.1016/S1471-4914(01)02090-1.
- Semple, J.W., J.E. Italiano, and J. Freedman. 2011. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* 11:264–74. doi:10.1038/nri2956.
- Smith, S.C., D. Chen, A. Collins, J.G. Harold, M. Jessup, S. Josephson, S. Logstrup, C. Jur, R.L. Sacco, P.E. Vardas, D.A. Wood, and W.A. Zoghbi. 2013. Moving From Political Declaration to Action on Reducing the Global Burden of Cardiovascular Diseases. *Circulation*. 128.
- Smyth, S.S., R.P. McEver, A.S. Weyrich, C.N. Morrell, M.R. Hoffman, G.M. Arepally, P.A. French, H.L. Dauerman, and R.C. Becker. 2009. Platelet functions beyond hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 7:1759–1766. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x.
- Song, S., A.J. Ewald, W. Stallcup, Z. Werb, and G. Bergers. 2005. PDGFR[beta]+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol.* 7:870–879.
- Stefanini, L., Y. Boulaftali, T.D. Ouellette, M. Holinstat, L. D??sir??, B. Leblond, P. Andre, P.B. Conley, and W. Bergmeier. 2012. Rap1-Rac1 circuits potentiate platelet activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32:434–441. doi:10.1161/ATVBAHA.111.239194.
- Stellos, K., S. Kopf, A. Paul, J. Marquardt, M. Gawaz, J. Huard, and H. Langer. 2010. Platelets in Regeneration. *Semin. Thromb. Hemost.* 36:175–184. doi:10.1055/s-0030-1251502.
- Stewart, D.J., J.D. Hilton, J.M.O. Arnold, J. Gregoire, A. Rivard, S.L. Archer, F. Charbonneau, E. Cohen, M. Curtis, C.E. Buller, F.O. Mendelsohn, N. Dib, P. Page, J. Ducas, S. Plante, J. Sullivan, J. Macko, C. Rasmussen, P.D. Kessler, and H.S. Rasmussen. 2006. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: A phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF121 (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther.* 13:1503–1511.
- Stimpfl, M., D. Tong, B. Fasching, E. Schuster, A. Obermair, S. Leodolter, and R.

6. Literatur

- Zeillinger. 2002. Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 8:2253–9.
- Thon, J.N., C.G. Peters, K.R. Machlus, R. Aslam, J. Rowley, H. Macleod, M.T. Devine, T.A. Fuchs, A.S. Weyrich, J.W. Semple, R. Flaumenhaft, and J.E. Italiano. 2012. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J. Cell Biol.* 198:561–574. doi:10.1083/jcb.201111136.
- Thurman, J.M., B. Renner, K. Kunchithapautham, V.P. Ferreira, M.K. Pangburn, Z. Ablonczy, S. Tomlinson, V.M. Holers, and B. Rohrer. 2009. Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury. *J. Biol. Chem.* 284:16939–16947. doi:10.1074/jbc.M808166200.
- Thygesen, K., J.S. Alpert, A.S. Jaffe, M.L. Simoons, B.R. Chaitman, H.D. White, H.A. Katus, F.S. Apple, B. Lindahl, D.A. Morrow, P.M. Clemmensen, P. Johanson, H. Hod, R. Underwood, J.J. Bax, R.O. Bonow, F. Pinto, R.J. Gibbons, K.A. Fox, D. Atar, L. Kristin Newby, M. Galvani, C.W. Hamm, B.F. Uretsky, P. Gabriel Steg, W. Wijns, J.P. Bassand, P. Menasché, J. Ravkilde, E. Magnus Ohman, E.M. Antman, L.C. Wallentin, P.W. Armstrong, J.L. Januzzi, M.S. Nieminen, M. Gheorghide, G. Filippatos, R. V. Luepker, S.P. Fortmann, W.D. Rosamond, D. Levy, D. Wood, S.C. Smith, D. Hu, J.L. Lopez-Sendon, R.M. Robertson, D. Weaver, M. Tendera, A.A. Bove, A.N. Parkhomenko, E.J. Vasilieva, S. Mendis, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B.A. Popescu, Ž. Reiner, U. Sechtem, P.A. Sirnes, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, J. Morais, C. Aguiar, W. Almahmeed, D.O. Arnar, F. Barili, K.D. Bloch, A.F. Bolger, H.E. Botker, B. Bozkurt, R. Bugiardini, C. Cannon, J. De Lemos, F.R. Eberli, E. Escobar, M. Hlatky, S. James, K.B. Kern, D.J. Moliterno, C. Mueller, A.N. Neskovic, B.M. Pieske, S.P. Schulman, R.F. Storey, K.A. Taubert, P. Vranckx, and D.R. Wagner. 2012. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 33:2551–2567. doi:10.1093/eurheartj/ehs184.
- Unemori, E.N., N. Ferrara, E.A. Bauer, and E.P. Amento. 1992. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 153:557–62. doi:10.1002/jcp.1041530317.
- Verschoor, A., and H.F. Langer. 2013. Crosstalk between platelets and the complement system in immune protection and disease. *Thromb. Haemost.* 110:910–919. doi:10.1160/TH13-02-0102.
- Yehoshua, Z., C.A. de Amorim Garcia Filho, R.P. Nunes, G. Gregori, F.M. Penha, A.A. Moshfeghi, K. Zhang, S. Sadda, W. Feuer, and P.J. Rosenfeld. 2014. Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: the COMPLETE study. *Ophthalmology.* 121:693–701.
- Zaslavsky, A., K.H. Baek, R.C. Lynch, S. Short, J. Grillo, J. Folkman, J.E. Italiano, and S. Ryeom. 2010. Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative

6. Literatur

- regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*. 115:4605–4613. doi:10.1182/blood-2009-09-242065.
- Zeibig, S., Z. Li, S. Wagner, H.-P. Holthoff, M. Ungerer, A. Bultmann, K. Uhland, J. Vogelmann, T. Simmet, M. Gawaz, and G. Munch. 2011. Effect of the oxLDL Binding Protein Fc-CD68 on Plaque Extension and Vulnerability in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 108:695–703. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.240515.
- Zhang, X., Y. Liu, Y. Gao, J. Dong, C. Mu, Q. Lu, N. Shao, and G. Yang. 2011. Inhibiting platelets aggregation could aggravate the acute infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Platelets*. 22:228–236. doi:10.3109/09537104.2010.543962.
- Zhou, H., H. Yan, P. Bertram, Y. Hu, L.E. Springer, R.W. Thompson, J. a Curci, D.E. Hourcade, and C.T.N. Pham. 2013. Fibrinogen-specific antibody induces abdominal aortic aneurysm in mice through complement lectin pathway activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:E4335-44. doi:10.1073/pnas.1315512110.
- Zhou, H., H. Yan, C.M. Stover, T.M. Fernandez, S. Rodriguez de Cordoba, W. Song, X. Wu, R.W. Thompson, W.J. Schwaeble, J.P. Atkinson, D.E. Hourcade, and C.T.N. Pham. 2012. Antibody directs properdin-dependent activation of the complement alternative pathway in a mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:E415–E422. doi:10.1073/pnas.1119000109.

7 ABBILDUNGEN

Abb. 1:	Pathophysiologie der Atherosklerose	7
Abb. 2:	Unterscheidung von Vaskulogenese und Angiogenese	10
Abb. 3:	Die Komplementaktivierung.....	13
Abb. 4:	Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen in der Angiogenese	20
Abb. 5:	Zeitlicher Ablauf der Matrigelversuche	27
Abb. 6:	Zeitlicher Ablauf der Hindlimb-ischemia-Versuche ohne systemische Thrombozytendepletion.....	30
Abb. 7:	Zeitlicher Ablauf der Hindlimb-ischemia-Versuche mit systemischer Thrombozytendepletion.....	32
Abb. 8:	Zugabe von Thrombozyten und bFGF ins Matrigel inhibiert die Endothelzellkernfläche pro Matrigelquerschnitt in vivo.....	46
Abb. 9:	Thrombozyten exprimieren den C5a-Komplementrezeptor, auch im angiogen aktiven ischämischen Muskelgewebe.....	48
Abb. 10:	Bei Aktivierung von Thrombozyten wird die C5aR-Expression hochreguliert	51
Abb. 11:	Koinkubation von WT- oder C5aR-Knockout-Thrombozyten hat keinen Effekt auf die Proliferation von MHE5-T-Endothelzellen	53
Abb. 12:	Koinkubation von C5aR-Knockout-Thrombozyten versus WT-Thrombozyten mit primären, murinen Lungen-Endothelzellen oder MHEC5-T Endothelzellen führt zu einer gesteigerten endothelialen Migration	55
Abb. 13:	Koinkubation von C5aR-Knockout-Thrombozyten versus WT-Thrombozyten mit primären murinen Lungen-Endothelzellen oder MHEC5-T Endothelzellen führt zu einer gesteigerten endothelialen Tube formation .	58
Abb. 14:	Wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese im Matrigelplug-Assay ist bei C5aR-Knockout-Mäusen verstärkt gegenüber WT-Tieren.....	59

7. Abbildungen

- Abb. 15: Hypoxiegetriggerte Angiogenese im Hindlimb-ischemia-Assay ist bei C5aR-Knockout-Mäusen verstärkt gegenüber WT-Tieren 62
- Abb. 16: WT- und C5aR-Knockout-Mäuse haben unter systemischer Thrombozytendepletion kein signifikant voneinander verschiedenes Angiogeneseniveau im Matrigelplug-Assay und dem Hindlimb-ischemia-Assay 65
- Abb. 17: Rescue-Experiment: Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout-Mäuse führt zu einer signifikanten Reduktion des Angiogeneseniveaus im Matrigel-Assay..... 68
- Abb. 18: Koinkubation von MHEC5-T Endothelzellen mit C5a-stimuliertem WT-Thrombozytenüberstand führt zu einer Inhibition der endothelialen Migration 70
- Abb. 19: Koinkubation von MHEC5-T Endothelzellen mit C5a-stimuliertem WT-Thrombozytenüberstand führt zu einer Inhibition der endothelialen Tube formation 71
- Abb. 20: Das Sekretom von frisch isolierten Thrombozyten wird durch C5a-Stimulation spezifisch beeinflusst: Thrombozyten sekretieren C5a-getriggert PF4 73
- Abb. 21: Rescue-Experiment mit PF4-Blockade: Retransfusion von WT-Thrombozyten in C5aR-Knockout-Mäuse führt bei gleichzeitiger PF4-Inhibition nicht zu einer signifikanten Reduktion des Angiogeneseniveaus im Matrigel-Assay 77

8 TABELLEN

Tabelle 1: Verwendete Mauslinien und ihre Herkunft	22
Tabelle 2: Zusammensetzung von ACD-Puffer	24
Tabelle 3: Zusammensetzung von Tyrodes-Puffer.....	24
Tabelle 4: Für die Immunfluoreszenzfärbung verwendete Puffer	34
Tabelle 5: Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper.....	36
Tabelle 6: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	38
Tabelle 7: Messwerte des Proteome Profiler Angiogenesis Kits (R&D) von WT- Thrombozytenüberstand nach Stimulation mit C5a oder Kontrolle	74

9 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Diese Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Innere Medizin, Abteilung für Kardiologie und Kreislauferkrankungen unter Betreuung durch Prof. Dr. Harald Langer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Langer, Dr. Johannes Patzelt und mich.

Die Isolierung von primären murinen Lungenendothelzellen (MLECs) erfolgte durch Dipl.-Biol. Frédéric Emschermann, AG Langer, Kardiologie. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung des Thrombozytenüberstands mittels des Proteome Profiler Mouse Angiogenesis Array Kits (R&D) durch unsere MTA, Sarah Gekeler. Sämtliche weiteren Versuche wurden nach Einarbeitung durch Prof. Langer, Dr. Johannes Patzelt, Sarah Gekeler sowie verschiedener weiterer Labormitglieder von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Langer durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Teile der vorliegenden Studie wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: Nording, H., Giesser, A., Patzelt, J., Sauter, R., Emschermann, F., Stellos, K., Gawaz, M, and H.F. Langer. 2016. Platelet bound oxLDL shows an inverse correlation with plasma anaphylatoxin C5a in patients with coronary artery disease. *Platelets*, 27(6), 593-597. Teile der Einleitung sind angelehnt an folgende Veröffentlichung: Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer. 2015. Platelets in Inflammation and Atherogenesis. *Front. Immunol.* 6:98.

Alle Abbildungen dieser Arbeiten stammen von mir. Die Manuskripte dieser Veröffentlichungen wurde von mir verfasst und von den Koautoren und insbesondere Prof. Langer korrigiert.

Tübingen, den 04.04.2017

10 VERÖFFENTLICHUNGEN

Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer. 2015. Platelets in Inflammation and Atherogenesis. *Front. Immunol.* 6:98. doi:10.3389/fimmu.2015.00098.

Nording, H.M., Giesser, A., Patzelt, J., Sauter, R., Emschermann, F., Stellos, K., Gawaz, M, and H.F. Langer. 2016. Platelet bound oxLDL shows an inverse correlation with plasma anaphylatoxin C5a in patients with coronary artery disease. *Platelets*, 27(6), 593-597.

Nording, H.M., F. Emschermann, J. Patzelt, K. Knoep, M. Mezger, A. Nording, D. Sedding, J. Koehl, M. Gawaz, P. von Hundelshausen, E. Chavakis E. Lammert, J. Lambris, T. Chavakis, and H.F. Langer. 2017. Complement anaphylatoxin C5a mediated release of PF4 from platelets modulates endothelial functions and controls growth factor- and ischemia-driven angiogenesis in vivo. Manuscript in preparation.

11 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich meinem Mentor und Doktorvater Prof. Dr. Harald Langer danken, welcher mich in die medizinische Grundlagenforschung eingeführt und von Anfang an exzellent betreut, beraten und gefördert hat.

Darüber hinaus möchte ich Johannes Patzelt und insbesondere Frédéric Em-schermann und Sarah Gekeler für die Einführung in zahlreiche Methoden und die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit danken. Mein Dank gilt ebenfalls allen weiteren Mitgliedern der AG Langer für ihre Hilfsbereitschaft und das Schaffen einer guten, kollegialen und konstruktiven Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren möchte ich dem klinischen Direktor der Kardiologie am Univer-sitätsklinikum Tübingen, Prof. Dr. Meinrad Gawaz, dafür danken, die Rahmenbe-dingungen für erfolgreiche medizinische Forschung in der Abteilung geschaffen zu haben und aufrecht zu erhalten.

Ich danke Prof. Dr. Daniel Sedding und Kai Knoep für die Einführung in die Methode der Hindlimb-ischemia- sowie Eckhard Lammert und Jennifer Axnick für die Einführung in die Methode des embryonal hindbrain stainings.

Schließlich danke ich dem IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakul-tät Tübingen und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie für die Unterstüt-zung dieser Arbeit.

Danke auch an Markus Wolters, Robert und Susanne Feil von der AG Feil sowie an Andreas Mack aus der Anatomie für Ihre Hilfe bei der Konfokalen Mik-roskopie.

Meiner Familie und unseren Freunden danke ich für all die Kraft und Unter-stützung, welche sie mir über die Jahre haben zuteil werden lassen. Insbeson-dere gilt mein Dank meiner Frau Anne, sowie meinen Eltern und Schwiegereltern.