

**Die Rolle der Thrombozyten in den frühen Phasen der Atherogenese:
eine *In-vivo*-Studie an der GPIIb/ApoE-Knock-Out-Maus**

Katrin Schürzinger

Aus der 1. Medizinischen Klinik
(Direktor Prof. Dr. med. A. Schömig)
und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
(Direktor Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)
der
Technischen Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. M. Gawaz

Vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Die Rolle der Thrombozyten in den frühen Phasen der Atherogenese:
eine *In-vivo*-Studie an der GPIIb/ApoE-Knock-Out-Maus**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Katrin Schürzinger
aus
Passau
München, 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität
München

- Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
1. Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
2. Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
3. Referent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers
4. Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
5. Referent: Univ.-Prof. Dr. K. Pfister

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Morphologie und Funktion von Blutplättchen	2
2.1.1	Anatomie der Thrombozyten	2
2.1.2	Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase	4
2.1.2.1	Adhäsion an subendotheliale Matrix	4
2.1.2.2	Thrombozytenaggregation	5
2.1.3	Heterotypische Interaktionen des aktivierten Thrombozyten	5
2.1.4	Thrombozytäre Membranglykoproteine	6
2.1.4.1	Integrine	6
2.1.4.1.1	Struktur und Einteilung	6
2.1.4.1.2	Der GPIIb-IIIa-Integrinrezeptor ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	7
2.1.4.1.3	Thrombozytäre β_1-Integrine	9
2.1.4.2	Leuzinreiche Glykoproteine	9
2.1.4.3	Selektine	10
2.1.4.4	Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulin-Typ	10
2.2	Morphologie und Funktion von Arterien	11
2.2.1	Wandaufbau der Arterien	11
2.2.2	Funktion des Gefäßendothels	12
2.3	Atherosklerose	13
2.3.1	Definition und Prävalenz der Atherosklerose	13
2.3.2	Pathogenese	13
2.3.3	Tiermodelle für Atherosklerose	17
2.4	Glanzmann Thrombasthenie	19
2.4.1	Klinik der Glanzmann Thrombasthenie	19
2.4.2	Tiermodelle der Glanzmann Thrombasthenie	19
3	ZIELSETZUNG UND ZEITLICHER ABLAUF DER ARBEIT	20
3.1	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
3.2	Zeitlicher Ablauf und thematischer Aufbau der experimentellen Verfahren	21

4	UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODEN	24
4.1	Wahl und Durchführung der Narkose	24
4.2	Zucht und Haltung der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-und ApoE^{-/-}-Mäuse	24
4.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	25
4.2.2	Durchführung der Mäusezucht	26
4.2.3	Genetische Identifikation der Doppel-Knock-out-Mäuse durch PCR und Gelelektrophorese	28
4.2.4	Durchflusszytometrische Immunophänotypisierung	31
4.3	Charakterisierung der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus	32
4.3.1	Durchflusszytometrische Analyse der Rezeptorlandschaft GPIIb-defizienter Blutplättchen	33
4.3.1.1	Versuchsprotokoll	33
4.3.2	Bestimmung der Blutungszeit	34
4.3.3	Funktionelle Evaluierung der Hämostase mittels Thrombelastographie	35
4.3.4	Kontrolle der Blutparameter	36
4.3.5	Sektion der Tiere	37
4.3.6	Histopathologische Untersuchungen	37
4.4	Die Kinetik der Thrombozytenadhäsion	38
4.4.1	Prinzip der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie	38
4.4.2	Aufbau des Arbeitsplatzes	39
4.4.3	Übersicht über den Versuchsverlauf	40
4.4.4	Blutentnahme, Thrombozytenisolation und Markierung der Thrombozyten	40
4.4.5	Vorbereitung des Empfängertieres für die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie	41
4.4.6	Durchführung der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie	42
4.4.7	Dokumentation	43
4.4.8	Auswertung der Videoaufzeichnungen	43
4.5	Der Ausprägungsgrad der atherosklerotischen Veränderungen	44
4.5.1	Bestimmung des plasmatischen Cholesterinspiegels	45
4.5.2	Duplexsonographische Bestimmung der Gefäßwandrigidität	45
4.5.3	Sudan-III-Färbung	47
4.5.4	Van Giesson-Färbung	48

4.6	Statistische Berechnungen _____	49
5	ERGEBNISSE _____	50
5.1	Die Zucht der GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Maus _____	50
5.1.1	Das Zuchtergebnis _____	50
5.1.2	Genotypisierung der Mäuse unter Verwendung von PCR und Gelelektrophorese _____	51
5.1.3	Prüfung des Phänotyps mittels Durchflusszytometrie _____	52
5.2	Die Charakterisierung der GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Maus _____	54
5.2.1	Durchflusszytometrische Analyse der Expression Adhäsions-vermittelnder thrombozytärer Membranproteine _____	54
5.2.2	Die Blutungszeit _____	56
5.2.3	Funktionelle Evaluierung der Hämostase _____	57
5.2.4	Einfluss der Gendefekte auf die Blutzusammensetzung _____	59
5.2.5	Charakterisierung der organischen Veränderungen – makroskopische Befunde _____	64
5.2.6	Charakterisierung der organischen Veränderungen – histopathologische Befunde _____	67
5.3	Charakterisierung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion <i>in vivo</i> _____	72
5.4	Der Ausbildungsgrad der Plaqueformation _____	74
5.4.1	Der plasmatische Cholesterinspiegel _____	74
5.4.2	Die Rigidität der Gefäßwand _____	76
5.4.3	Morphologische Charakterisierung der Atheroprogression _____	77
5.4.4	Histomorphometrie _____	81
6	DISKUSSION _____	84
6.1	Die angewandten experimentellen Verfahren _____	84
6.1.1	Das Tiermodell _____	84
6.1.1.1	Wahl des Mausmodells _____	85
6.1.1.2	Die Etablierung der GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Maus als neues Tiermodell _____	85
6.1.2	Charakterisierung der Blutplättchen-Endothel-Interaktion _____	87
6.1.3	Charakterisierung des Ausprägungsgrades der atherosklerotischen Läsion _____	88
6.1.4	Einfluss der Thrombozytenadhäsion auf die Atheroprogression _____	89
6.1.5	Ausblick _____	93

7	ZUSAMMENFASSUNG _____	94
8	SUMMARY _____	95
9	LITERATURVERZEICHNIS _____	96
10	TABELLENVERZEICHNIS _____	108
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS _____	109
12	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS _____	110
13	DANKSAGUNG _____	112
14	LEBENS LAUF _____	113

1 EINLEITUNG

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2001 in Deutschland über 245.000 Menschen an koronarer Herzerkrankung und den Folgen eines Herzinfarktes. Dies sind fast 30% aller Todesfälle. Wie eine Langzeitstudie der WHO (Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease = MONICA), die von Mitte 80er bis Mitte der 90er Jahre durchgeführt wurde, zeigt, verringert ein verbessertes therapeutisches Management bei akutem Koronarsyndrom und Myokardinfarkt die Mortalität¹⁵⁴. Bei weltweit kontinuierlich steigenden Zahlen an Personen, die an den Folgen der Atherosklerose erkranken^{100,101}, ist es aber zudem unerlässlich, die Inzidenz der Grunderkrankung zu reduzieren. Strategien der Prävention sollen die klinische Ausprägung der Atherosklerose verhindern. Sie können aber nur optimiert werden, wenn die Pathomechanismen der Initiation und Progression atherosklerotischer Läsionen besser verstanden sind.

Während der Atherogenese ist ein komplexes zelluläres Zusammenspiel von Blutplättchen, Leukozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen zu beobachten. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Analyse der pathophysiologischen Bedeutung der Thrombozyten in der frühen Atherogenese. Ziel der Arbeit ist es, die Rolle der Thrombozyten in der beginnenden Atherosklerose zu definieren. Hierzu soll insbesondere die Bedeutung einer durch das thrombozytäre Membranglykoprotein GPIIb-IIIa vermittelten Thrombozytenadhäsion geklärt werden. Um diese Fragestellungen bearbeiten zu können, wird ein neues Mausmodell etabliert, an dem das Verhalten der Thrombozyten und die Plaqueformation evaluiert werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Morphologie und Funktion von Blutplättchen

Blutplättchen sind die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile. Eine physiologische Zahl von 150000-300000/ μl der 2-4 μm großen Thrombozyten zirkuliert im Blut⁴⁰. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Hämostase. Ihre Funktionen sind sehr vielfältig und in einigen Aspekten ähneln Thrombozyten den Leukozyten³⁶, denn Thrombozyten vermögen es Formveränderungen auszuführen. Zusätzlich können sie Sauerstoffradikale bilden⁸² und chemotaktische Faktoren für neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten abgeben^{30,90}. Außerdem weisen sie bakterizide⁶⁰ und gegen Blutparasiten¹³ und Tumorzellen^{63,112} gerichtete zytotoxische Aktivität auf.

2.1.1 Anatomie der Thrombozyten

Thrombozyten sind anukleäre Zellen, die im Knochenmark und retikuloendothelialen System der Leber und Milz aus Megakaryozyten gebildet werden. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt 7 bis 10 Tage^{40,43}.

Im nichtaktivierten Zustand weisen Blutplättchen eine diskoide, bikonkave Form auf. Mit der Aktivierung verändern sie ihre Form zu sternförmigen Echinosphärozyten, die durch zahlreiche lange Ausstülpungen der Plasmamembran, den sogenannten Pseudopodien, charakterisiert sind^{40,161}.

Die **periphere Zone** bildet die Oberfläche des Thrombozyten. Sie besteht aus einer äußersten Schicht, der Glykokalix, die reich an verschiedenen Proteinen und Mucopolysacchariden ist. Die mittlere Schicht stellt eine phospholipidreiche Zytoplasmamembran, in der Membranproteine eingebettet sind, dar. Der Zytoplasmamembran innen anschließend befindet sich die dritte Schicht der peripheren Zone. Diese submembranöse Region zeichnet sich durch Filamente aus, die eine enge Verbindung zur mittleren Schicht herstellen und somit Signale von der Thrombozytenoberfläche über chemische und physikalische Veränderungen für das Zellinnere übersetzen können^{40,161}.

Als **strukturelle Zone** des Thrombozyten bezeichnet man das gelartige Zytoplasma der Zelle. In ihr findet man ein Netzwerk aus unterschiedlichen Strukturproteinen, die das Zytoskelett bilden und hauptsächlich aus Aktin und Aktin-Bindungsproteinen bestehen. Während des Prozesses der Thrombozytenaktivierung reorganisieren die Strukturproteine die Zellorganellen, zu denen sie eine Verbindung besitzen⁴⁰. Zusätzlich treten drei verschiedene Fasertypen, die submembranösen Filamente, Mikrofilamente und zum größten Teil Mikrotubuli im Blutplättchen auf. Sie sind an der Formveränderung während der Zellaktivierung maßgeblich beteiligt¹⁶¹.

Die **Zone der Organellen** liegt im Zytoplasma und besteht aus Mitochondrien und drei Formen thrombozytärer Speichergranula. Letztere kann man in dichte Granula („electron dense-bodies“), Lysosomen und α -Granula unterteilen⁴⁰. Dichte Granula enthalten Substanzen, wie zum Beispiel Adenin-Nukleotide, Serotonin, Pyrophosphate und Calcium, die den Aggregationsprozess fördern. Lysosome speichern hydrolytische Enzyme und unterscheiden sich kaum von Lysosomen anderer Zellen. In α -Granula, welche die häufigste Form der thrombozytären Speichergranula darstellen, befinden sich Adhäsionsrezeptoren, Zytokine und Gerinnungsfaktoren. Diese Substanzen beteiligen sich an verschiedensten Funktionen der Blutplättchen, wie zum Beispiel der Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis und Inflammation^{40,62}.

Der vierte morphologische Bereich ist das **Membransystem**. Es setzt sich aus dem offenen kanalikulären System (surface connected, open canalicular system = OCS) und dem dichten tubulären System (dense tubular system = DTS) zusammen⁸. Das offene kanalikuläre System besteht aus weit in das Zellinnere reichenden, gewundenen Tunneln der Zellwand, die miteinander verbunden – ein Kanalnetzwerk bilden und dadurch die Gesamtoberfläche des Thrombozyten stark vergrößern¹⁶². Über Poren in der Zellwand der eingestülpten Kanäle ist eine Verbindung zum Extrazellulärraum hergestellt, über die Stoffe aus dem Plasma in das Zellinnere oder aus den Zellorganellen nach außen gelangen können. Das dichte tubuläre System ist ein Residuum des rauhen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. Es enthält hohe Konzentrationen an freien Kalzium-Ionen, die bei Bedarf in das Zytoplasma sezerniert werden können und zu einer Aktivierung des Thrombozyten führen¹⁶⁰.

2.1.2 Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase

2.1.2.1 Adhäsion an subendotheliale Matrix

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im Blut ohne mit Strukturen der Gefäßwand oder anderen Blutzellen in Kontakt zu treten^{32,35,87,159}. Bei Schädigung des Gefäßendothels werden subendotheliale Matrixproteine, wie zum Beispiel Kollagen, Fibronectin und der von-Willebrand-Faktor, freigelegt, an denen Blutplättchen adhären können^{10,27-29}. Der Kontakt der Blutplättchen mit subendothelialer Matrix triggert eine Vielzahl von Prozessen, die die Zellen von einem ruhenden in den aktivierten Zustand überführen.

Metabolische Mechanismen: Die Bindung von Agonisten an der Thrombozytenoberfläche bewirkt über Signaltransduktion einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies hat wiederum die Bildung von Thromboxan A_2 zur Folge, welche die Degranulation der Granula fördert und die Stimulation des GPIIb-IIIa-Komplexes bewirkt^{61,70,142}. Auch die Aktivierung der Proteinkinase C führt zur Freisetzung von Stoffen aus den Granula^{67,158,164} und zur Konformationsveränderung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa.

Formveränderung: Die Zellen verändern ihre Form (sog. „shape change“), in dem sie sich flach ausspreizen (sog. „spreading“) und Pseudopodien ausbilden.

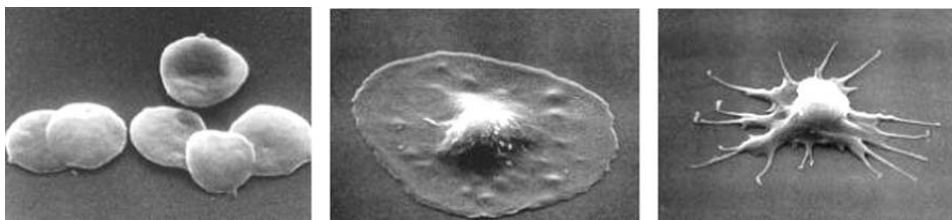


Abbildung 1: Thrombozytenaktivierung

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ruhende Thrombozyten mit diskoider Form (Bild 1), einen flach ausgespreizten Thrombozyten (Bild 2) und die Ausbildung von Pseudopodien (Bild 3).

(Elektronenmikroskopie nach <http://www.bi.umist.ac.uk/users/mjmfam>)

Veränderung der Thrombozytenoberfläche: Die Formveränderung der Blutplättchen vermittelt die Expansion der reaktiven Gesamtoberfläche⁴⁰.

Zusätzlich werden Membranproteine in ihrer Anzahl, Konformation und Lage verändert. So wechselt beispielsweise der GPIIb-IIIa-Komplex seine Konformation und ist damit zur

Bindung von Fibrinogenen fähig. Zusätzlich wird die Oberflächendichte dieses Rezeptors durch Freisetzung aus internen Speichern erhöht. Weiterhin bedingt die Veränderung der Phospholipidorientierung der Plasmamembran die Anlagerung von Gerinnungsfaktoren. Dies steigert die Thrombinbildung in der Umgebung des aktivierten Blutplättchens⁴⁰.

2.1.2.2 Thrombozytenaggregation

Als Aggregation bezeichnet man die Anlagerung von Thrombozyten an bereits adhärenente Blutplättchen¹², also die homotypische Interaktion zwischen Thrombozyten. Mit der Sekretion von Granula gelangen prokoagulatorische Substanzen in das Milieu des adhärenenten Thrombozyten, die weitere, noch zirkulierende Thrombozyten aktivieren. Auch Ca^{2+} und Fibrinogen werden in hohen Konzentrationen abgegeben. Dadurch kann sich Fibrinogen in einer Ca^{2+} -abhängigen Reaktion an den GPIIb-IIIa-Komplex binden und über Fibrinogenbrücken mit anderen Thrombozyten aggregieren^{61,120}. Eine Vielzahl von weiteren Mechanismen, wie die vermehrte Expression verschiedener thrombozytärer Membranproteine, erleichtert es einem aktivierten Thrombozyten zudem, homotypische Kontakte einzugehen.

2.1.3 Heterotypische Interaktionen des aktivierten Thrombozyten

Thrombozyten können mit einer Vielzahl von nicht-thrombozytären, vaskulären Zellen interagieren. Insbesondere sind hier Leukozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen zu nennen.

Bei Aktivierung werden neben prokoagulatorischen Substanzen aus den α -Granula auch zytokinähnliche Substanzen frei, wie zum Beispiel β -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4 und RANTES, die Leukozyten anlocken und deren Aktivierung bewirken^{68,71,165}. Leukozyten wiederum lösen ihrerseits prokoagulatorische Prozesse aus, die die Thrombusformation weiter vorantreiben¹¹⁷.

Degranulierte Wachstumsfaktoren, wie der „platelet derived growth factor“ (PDGF) und der „transforming growth factor- β “ (TGF- β) initiieren Umbauvorgänge der Gefäßwand. Sie fördern die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen^{56,58,62}.

Thrombozyten können nicht nur an subendothelialer Matrix anhaften. Denn unter pathophysiologischen Umständen vermögen es Thrombozyten außerdem an Endothelzellen mit veränderten adhäsiven Eigenschaften zu binden. Interleukin-1 β (IL-1 β) und der „CD40-Ligand“ (CD40-L) stellen Substanzen dar, die mit Aktivierung der Thrombozyten in das Plasma abgegeben bzw. vermehrt exprimiert werden^{59,91}. Sie triggern endotheliale Alterationen, die eine Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen erlauben^{41,42,85}. Bestimmte thrombozytäre Membranglykoproteine ermöglichen dem Blutplättchen, Kontakt mit dem Endothel aufzunehmen und daran fest zu adhäreren (siehe Abschnitt 2.1.4).

2.1.4 Thrombozytäre Membranglykoproteine

Die thrombozytären Funktionen während der Hämostase setzen ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, Strukturen der Gefäßwand und plasmatischen Gerinnungsfaktoren voraus. Thrombozytäre Membranrezeptoren, auch Adhäsionsrezeptoren genannt, ermöglichen den Kontakt. Man unterteilt diese Rezeptoren gemäß ihrer Molekülstruktur in vier Gruppen: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp.

2.1.4.1 Integrine

2.1.4.1.1 Struktur und Einteilung

Eine Vielzahl von Körperzellen, wie Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren Integrine, die maßgeblich an Prozessen der Zelldifferenzierung, Migration, Proliferation und Zelladhäsion beteiligt sind^{137,139}. Charakteristisch für Integrine ist die heterodimere Struktur, bestehend aus einer α - und einer nicht-kovalent gebundenen β -Untereinheit. Die Klassifizierung der Integrine erfolgt anhand ihrer β -Untereinheit. Acht β -Ketten und 14 α -Ketten, die sich zu einem funktionellen Rezeptor paaren, sind bekannt. Bisher sind fünf thrombozytäre Integrinrezeptoren identifiziert, von denen drei der β_1 -Klasse angehören ($\alpha_2\beta_1$ = Kollagenrezeptor, $\alpha_5\beta_1$ = Fibronektinrezeptor, $\alpha_6\beta_1$ = Lamininrezeptor) und zwei der β_3 -Klasse zugeordnet werden ($\alpha_{IIb}\beta_3$ = Fibrinogenrezeptor, $\alpha_v\beta_3$ = Vitronektinrezeptor).

Integrine interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen (z.B. Kollagen, Fibrinogen), die in löslicher Form im Plasma vorkommen oder Bestandteil extrazellulärer Strukturen sind. Die Regulation der Integrin-Ligand-Interaktionen erfolgt über eine gesteigerte Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche, über Affinitätsmodulation mittels Konformationsänderung der extrazellulären Domäne und über divalente Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}), deren Anwesenheit für die Bindung der Liganden erforderlich ist^{107,135}.

Eine schnell gesteigerte Präsentation der Integrine an der Zelloberfläche erreicht das Blutplättchen durch Fusion von Integrin-speichernden Granula mit der Zellmembran¹³⁵.

Bindung von Agonisten, wie Thrombin und ADP, an ihre thrombozytären Membranrezeptoren induziert über intrazelluläre Signalwege eine Konformationsänderung einiger Integrinrezeptoren, die so aktiviert werden. Man nennt diesen Mechanismus „Inside-Out Signaling“. Die Bindung von Liganden an Integrine selbst kann ebenfalls zu einer Affinitätssteigernden Konformationsänderung führen und die Zelle aktivieren. Diesen Prozess bezeichnet man „Outside-In Signaling“^{120,136-139}.

2.1.4.1.2 Der GPIIb-IIIa-Integrinrezeptor ($\alpha_{IIb}\beta_3$)

Das Integrin GPIIb-IIIa, auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet, stellt das einzige bisher bekannte Integrin dar, das ausschließlich von Thrombozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird. Mit einer Oberflächenbesetzung von etwa 50000 Rezeptoren pro Thrombozyt ist es zugleich das häufigste thrombozytäre Membranprotein^{49,120-122} und stellt einen 1,5% bis 2% Anteil am thrombozytären Gesamtprotein²⁰.

Während β_1 -Integrine vorwiegend an Proteine der extrazellulären Matrix binden, mediiert das GPIIb-IIIa zusätzlich Zell-Zell-Interaktion^{11,85}.

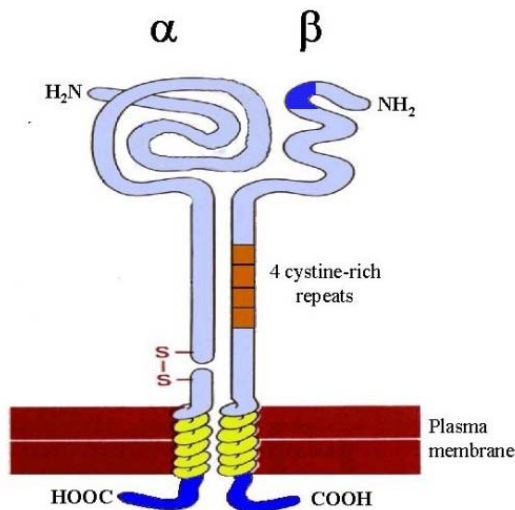


Abbildung 2: Integrinstruktur

Schematische Darstellung der Struktur des GPIIb-IIIa-Komplexes. Die blau markierte Stelle am aminoterminalen Ende der β -Kette zeigt die Lokalisation der RGD-Aminosäureerkenntnissequenz (modifiziert nach <http://www.medicine.ox.ac.uk/ndog/mardon/integrin.htm>).

Das GPIIb-IIIa ist ein multifunktionaler Rezeptor, der mindestens vier Proteine binden kann: Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Vitronektin und Fibronektin. Die β_3 -Kette erkennt eine Arginin-Glyzin-Aspartat (RGD)-Aminosäuresequenz, die allen obig genannten Liganden gemeinsam ist^{84,122}. Zentrale Funktion des GPIIb-IIIa stellt die Bindung von löslichem Fibrinogen dar. Denn die Bildung von Fibrinogenbrücken zwischen Thrombozyten ist die Voraussetzung für die Aggregation. Für die effektive Bindung von Fibrinogen ist ein Konformationsshift nötig, der den Rezeptor in einen hoch-affinen Zustand bringt. Diese Konformationsänderung wird von Thrombozytenagonisten, wie ADP, Thrombin und Adrenalin induziert.

Nach initialer Aktivierung kommt es neben der Affinitätsmodulation der bereits an der Oberfläche exprimierten GPIIb-IIIa-Komplexe zu einer starken Zunahme des präsentierten Integrins, weil Granula, die GPIIb-IIIa enthalten, mit der Zellmembran verschmelzen. Die Bindung von Fibrinogen an das GPIIb-IIIa löst eine intrazelluläre Signalkaskade („Outside-In Signaling“) aus, die die Stabilisierung von Thrombozytenaggregaten reguliert, zur Freisetzung bestimmter granulärer Speicherstoffe, zum Beispiel CD40-L, führt und die Formveränderung des Plättchen kontrolliert^{97,139}.

Das GPIIb-IIIa vermittelt zudem eine Adhäsion von aktivierten Thrombozyten an die intakte Endothelzellschicht^{11,126,146,150,150}. Diese Bindung wird durch eine Brückenbildung

verschiedener adhäsiver Proteine, wie Fibrinogen, zwischen dem thrombozytären GPIIb-IIIa-Komplex und den endothelialen Rezeptoren „intracellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelt¹¹. Die GPIIb-IIIa-vermittelte Bindung kann auch über den von-Willebrand-Faktor zu dem endothelialen GPIIb-Rezeptor geknüpft werden^{11,129,140}. Die feste Adhäsion von Blutplättchen am Endothel führt *in vitro* zu einer inflammatorischen Reaktion der Endothelzellen, die dann vermehrt adhäsive Eigenschaften und proteolytische Aktivität aufweisen⁹¹.

2.1.4.1.3 Thrombozytäre β_1 -Integrine

Blutplättchen besitzen drei Integrine der β_1 -Klasse, den Kollagenrezeptor ($\alpha_2\beta_1$ -Integrin), Fibronektinrezeptor ($\alpha_5\beta_1$ -Integrin) und Lamininrezeptor ($\alpha_6\beta_1$ -Integrin). Sie sind an der primären Adhäsion und Aktivierung der Blutplättchen beteiligt. Ihre Bedeutung ist derzeit noch unzureichend geklärt und wird kontrovers diskutiert¹⁰⁹⁻¹¹¹.

2.1.4.2 Leuzinreiche Glykoproteine

Außer Integrinen exprimieren Thrombozyten noch eine weitere Familie von Membranglykoproteinen, die sich durch ihren Reichtum an der Aminosäure Leuzin auszeichnen. Zu ihnen gehören das Glykoprotein GPIb-V-IX, welches den von-Willebrand-Faktor, P-Selektin und Thrombin bindet, und das Glykoprotein GPIV⁴⁰.

Der GPIb-V-IX-Komplex spielt in der primären Hämostase bei hohen Scherkräften, wie sie zum Beispiel in arteriellen Strömungsbereichen auftreten, eine wichtige Rolle. Aufgrund einer hoch-affinen Bindung des GPIb-V-IX an in Kollagenfibrillen immobilisierten von-Willebrand-Faktor vermögen zirkulierende Thrombozyten einen initialen Kontakt mit der Gefäßwand herzustellen und zu adhären^{132,133}.

Gleichwie das GPIIb-IIIa vermittelt auch GPIb-V-IX zusätzlich die direkte Bindung an intakte Endothelzellen, die im dysfunktionellen Zustand P-Selektin und von-Willebrand-Faktor exprimieren^{4,36,85,87,88,131}. Im Gegensatz zum GPIIb-IIIa-medierten Kontakt, findet das Plättchen aber via GPIb-V-IX keine feste, sondern nur eine transiente Verbindung zum Endothel.

2.1.4.3 Selektine

Eine weitere Familie thrombozytärer Membranrezeptoren bilden die Selektine, deren Molekülstruktur eine extrazelluläre Lektindomäne mit einer benachbarten „Epidermal growth factor-like“-Domäne aufweist^{39,55,74,92-96}. Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren die heterotypische Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Thrombozyten besitzen das P-Selektin, welches auch bei Endothelzellen vorkommt. P-Selektin liegt in den thrombozytären α -Granula und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert vor und wird nur bei Aktivierung an der Oberfläche der Zellen exprimiert. Es fördert die Anlagerung von Leukozyten an der Endothelläsion und induziert die inflammatorische Rekrutierung der Leukozyten¹⁴⁸. Zudem vermittelt es Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten^{113,148}.

2.1.4.4 Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulin-Typ

Bisher wurden drei Adhäsionsrezeptoren des Immunglobulintyps im Blutplättchen beschrieben. Die Bedeutung des „platelet-endothelial cell adhesion molecule-1“(PECAM-1) und des „intracellular adhesion molecule- 2“ (ICAM-2) ist bislang weitgehend ungeklärt. Die Rezeptoren scheinen aber eine Rolle für heterotypische Zell-Zell-Interaktionen zu spielen⁴⁰. Auch das Glykoprotein GPVI gehört zu der Gruppe der Immunglobuline und ist ein thrombozytärer Kollagenrezeptor¹⁰⁹. GPVI besitzt ein Molekulargewicht von 60kDa und ist nicht-kovalent an den thrombozytären Fc γ -Rezeptor gebunden, der Voraussetzung für die adäquate Expression von GPVI ist. Während das GPVI die Bindung an Liganden vermittelt, induziert der Fc γ -Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade^{9,34,45,108,124,168}, die die Aktivierung und Sekretion initiiert¹¹⁹. Dieser Rezeptorkomplex fungiert als thrombozytärer Kollagenrezeptor, der möglicherweise eine zentralere Rolle als das Integrin $\alpha_2\beta_1$ (= Kollagenrezeptor) einnimmt^{89,109}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Thrombozyt eine Vielzahl unterschiedlicher Adhäsionsrezeptoren exprimiert, die ihn zu heterotypischen und homotypischen Zell-Zell-Interaktionen befähigen. Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren mediiieren damit nicht nur hämostatische Prozesse, sondern vermitteln auch proinflammatorische Funktionen des Thrombozyten.

2.2 Morphologie und Funktion von Arterien

2.2.1 Wandaufbau der Arterien

Arterien gehören dem elastischen (Aa. elastotypicae) und muskulären Typ (Aa. myotypicae) an, doch besitzen alle einen gemeinsamen Grundbauplan, der mit drei ineinander gesteckten Röhren zu vergleichen ist^{57,76}.

Die **Intima (Tunica interna)** bildet die innerste Schicht und lässt sich nochmals unterteilen in das einschichtige Endothel (Lamina endothelialis), gefolgt von einer Basalmembran, dem bindegewebigen Subendothel (Stratum subendotheliale) und der Membrana elastica interna.

Die mittlere Schicht bildet die **Media (Tunica media)**, die durch mehrere Lagen glatter Muskulatur ausgezeichnet ist und einen variierenden Gehalt an elastischen und kollagenen Fasern aufweist. An der Grenze zur äußersten Schicht befindet sich die Membrana elastica externa.

Die äußere Schicht bildet die sogenannte **Adventitia (Tunica externa)**, die aus einem Netzwerk von fibroelastischen Fasern des Kollagen-Typs I aufgebaut ist^{57,76}.

Gefäßwände werden von sympathischen Nervenfasern innerviert. Ihre Ernährung ist in der Tunica interna über Diffusion gewährleistet, während die beiden äußeren Schichten über Vasa vasorum durchblutet werden^{57,76}.

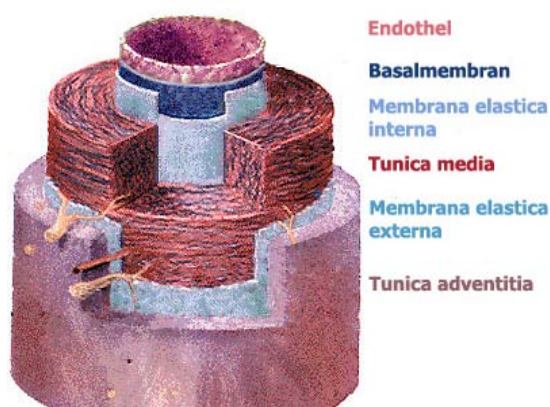


Abbildung 3: Gefäßaufbau

Schematische Darstellung der Schichtung der Arterienwand. Vasa vasorum und sympathischen Nervenfasern sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht beschriftet (modifiziert nach <http://www.bmb.psu.edu/courses>).

Arterien des elastischen Typs sind stets herznahe Gefäße, die während der Systole durch Aufdehnung sehr viel Blut aufnehmen können. Charakteristisch für sie ist eine ausgeprägte Elastizität, die durch ein dickes Stratum subendotheliale mit Bindegewebsfasern, die mit dem elastischen Gewebe der Media in Kontakt stehen, gewährleistet wird. Zusätzlich weisen sie einen hohen Grad an elastischen Fasern in der Tunica media auf, die mit einzelnen glatten Muskelzellen Verbindung haben und so ein elastisch-muskuläres Netzwerk entstehen lassen. Weil diese Gefäße Druck aufnehmen können, den sie später kontinuierlich an die Blutsäule abgeben, bezeichnet man sie auch als „Windkesselgefäße“. Die Arterien des muskulären Typs dagegen zeichnen sich durch einen großen Gehalt an Muskelzellen in der Media auf, deren Kontraktilität die Aufrechterhaltung des Blutdrucks im arteriellen System garantiert^{57,76}.

2.2.2 Funktion des Gefäßendothels

Das Endothel ist das größte autokrine, parakrine und endokrine Organ des Körpers, das im Menschen eine Fläche von etwa 700m² umfasst und ein Gewicht von ca. 1,5kg hat¹⁵⁶. Die Funktionen des Endothels umfassen die Regulation des Gefäßtonus, Lipidmetabolismus und Angiogenese. Weiterhin nehmen die Endothelzellen an entzündlichen Prozessen teil, beeinflussen die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten und kontrollieren die Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation^{19,31,38,46,48}.

Vereinfachend kann man sagen, dass das Endothel einen physiologischen und einen pathophysiologischen Phänotyp annehmen kann. Im physiologischen, antithrombotischen Zustand verhindert das Endothel die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten, wirkt Fibrinablagerung und Thrombinbildung entgegen und fördert die Vasodilatation. Nach Einwirken physikalischer oder inflammatorischer Reize verhält sich das Endothel prothrombotisch. Dies führt nicht nur zu einer erleichterten Hämostase und Thrombusbildung, sondern auch zu einer vermehrten Leukozytenaktivierung und Vasokonstriktion. Zusätzlich wird die Proliferation glatter Muskelzellen der Media gefördert. Man bezeichnet das Endothel in diesem Zustand auch als dysfunktionelles Endothel⁶. Bei vorliegender Dysfunktion vermögen Thrombozyten direkt an der intakten Endothelzellschicht zu adhären¹²⁶.

2.3 Atherosklerose

2.3.1 Definition und Prävalenz der Atherosklerose

Die Welt-Gesundheits-Organisation WHO definiert den Begriff Atherosklerose als „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“¹²⁷. Atherosklerose ist die häufigste Arterienerkrankung, deren wesentliche Folgekomplikationen Herzinfarkt, Schlaganfall und arterielle Beindurchblutungsstörungen sind. Sie beschreibt einen chronisch-progredienten, inflammatorischen Prozess, deren häufigste klinische Manifestation die koronare Herzerkrankung darstellt. Die koronare Herzerkrankung hat sich global zur Haupttodesursache mit steigender Tendenz in Gesamtmortalität und –morbidity entwickelt^{100,101}.

2.3.2 Pathogenese

Die Pathophysiologie des atherosklerotischen Gefäßumbaus ist bis heute noch nicht im Detail geklärt. Nach vorherrschender Meinung beginnt der Prozess aufgrund einer gesteigerten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine, die zu einer vermehrten Ablagerung von cholesterinreichen Lipoproteinen in der Intima führt^{99,130}. Der Grad der Transsudation von Lipoproteinen in die subendotheliale Matrix nimmt mit der LDL-Serumkonzentration zu. Neben LDL-Partikeln reichern sich weitere Lipoproteine, wie Lipoprotein (a) und „Lipoprotein-Remnants“ an, die einer oxidativen und möglicherweise auch enzymatischen Modifikation unterliegen. Die oxidierten Partikel wirken stark proinflammatorisch und versetzen das Endothel in einen dysfunktionellen Zustand^{3,21,22,98,106}. Die Endothelzellen reagieren mit verminderter Produktion an Stickstoffmonoxid^{3,21,22}, ein hochpotenter Thrombozyteninhibitor, und gesteigerter Synthese von Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, die eine Leukozytenrekutierung hervorrufen^{23,24,79,103}. Derartige endotheliale Veränderungen findet man vor allem in Bereichen von Arterienaufzweigungen, in denen turbulente anstelle von laminaren Strömungen vorherrschen und einen alterierten mechanischen Reiz auf die Gefäßwand ausüben^{26,47,75,151}. Studien der eigenen Arbeitsgruppe

konnten zeigen, dass bereits zu diesem Zeitpunkt Thrombozyten am Endothel der veränderten Regionen zu adhären beginnen^{51,85}.

Das erste Stadium nach der Initiation des atherosklerotischen Prozesses umfasst die Bildung von sogenannten „fatty streaks“. Monozyten, die am Endothel adhären, in die Intima transmigrieren und zu Makrophagen werden, nehmen mithilfe von „scavenger Rezeptoren“ stark modifizierte Lipoproteine auf und transformieren zu Schaumzellen. Sowohl Makrophagen und Lymphozyten, als auch Endothelzellen fördern außerdem über die Abgabe von Wachstumsfaktoren die Proliferation glatter Muskelzellen^{17,130}.

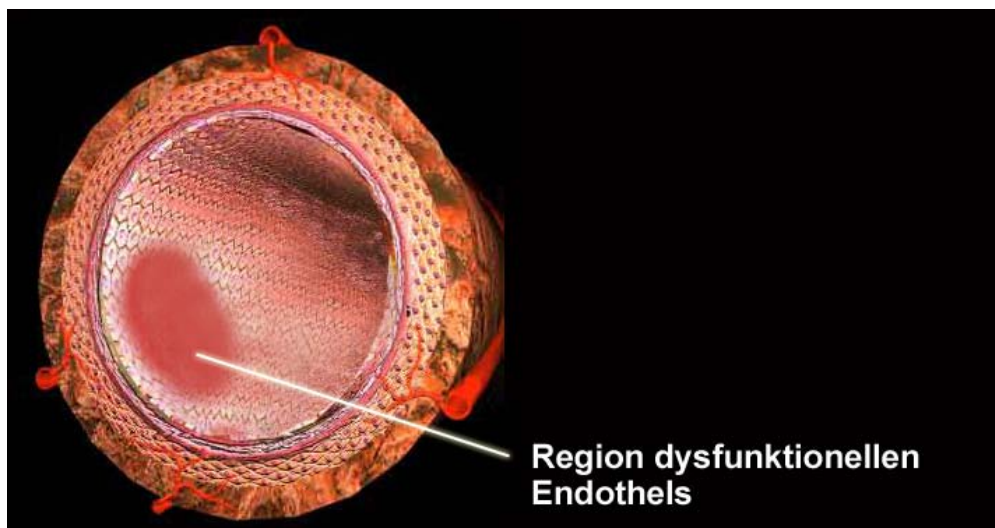


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation

Nach Einwirken mechanischer und chemischer Reize entsteht eine Region dysfunktionellen Endothels [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

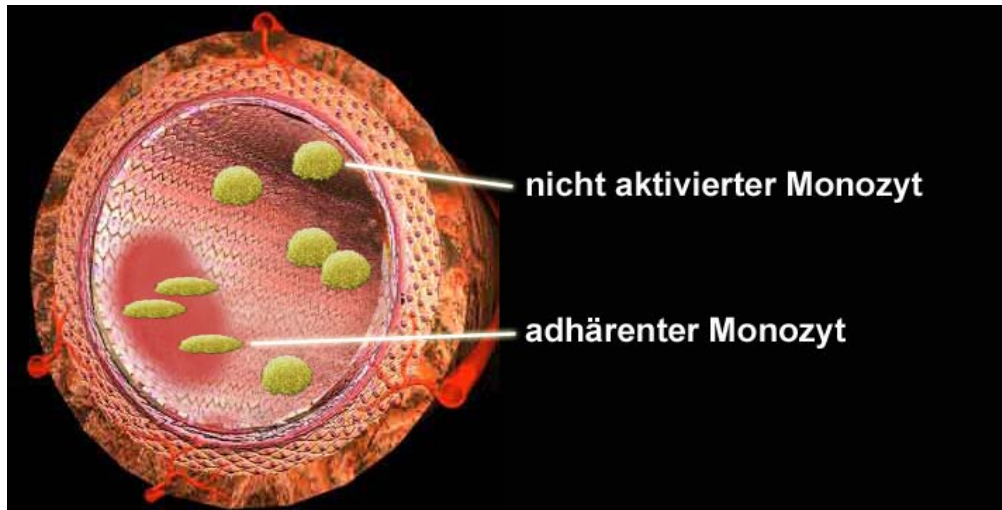


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation

Monozyten adhären an dysfunktionellen Endothelzellen und transmigrieren durch das Endothel in die Gefäßintima [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

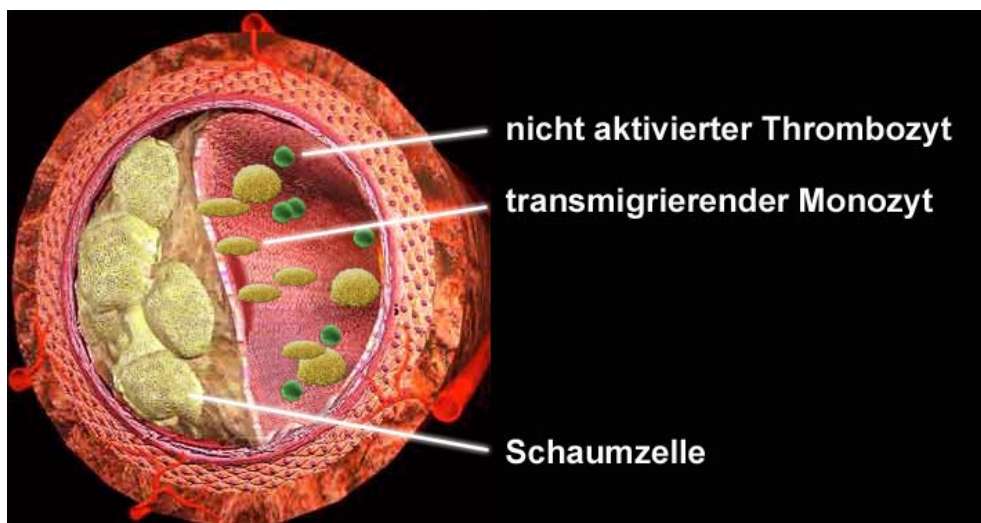


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Atherogenese: Stadium der ‚Fatty streaks‘

Transmigrierte Monozyten haben als Makrophagen modifizierte Lipoproteine aufgenommen und sich zu Schaumzellen entwickelt [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

Das zweite Stadium zeichnet sich durch die Entstehung einer fibrösen Kappe aus, die ein nekrotisches Zentrum umschließt. Einige Zeit nach massiver Aufnahme von oxidierten lipidreichen Partikeln sterben Schaumzellen ab und bilden ein lipidreiches „necrotic core“. Dieses wird von einer fibrösen Lage begrenzt, die von akkumulierenden und proliferierenden Muskelzellen gebildet wird⁷⁸. Durch eine kontinuierliche Einwanderung von Monozyten

wächst die Läsion zunehmend. Bleibt dabei eine stabile fibröse Kappe erhalten, spricht man von einer stabilen Plaque.

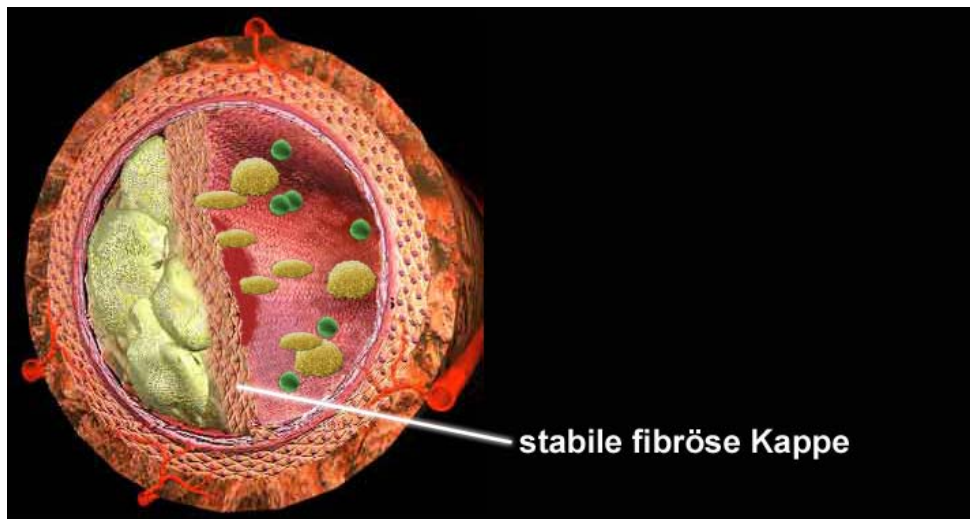


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Atherogenese: Stadium der stabilen fibrösen Kappe

Akkumulierte und proliferierte Muskelzellen schließen Schaumzellen und das nekrotische Zentrum ein [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

Ein drittes Stadium der fortgeschrittenen Läsion ist erreicht, wenn die fibröse Begrenzung an Stabilität verliert und rupturiert. Man bezeichnet diese atherosklerotischen Veränderungen als instabile Plaques^{78,130}.

Die fibröse Kappe wird dünner, wenn das Gleichgewicht zwischen Degradation und Neubildung der extrazellulären Matrix gestört ist⁷⁸. Während glatte Muskelzellen kontinuierlich Matrix bilden, greifen aktivierte Makrophagen diese aufgrund einer Freisetzung von proteolytischen Enzymen an. Eine vermehrte Akkumulation von aktivierten Monozyten im Bereich der Plaqueschultern schwächt die Kappe⁶⁶. Zusätzlich können aus T-Lymphozyten freigesetzte Faktoren, wie Interferon- γ (IFN- γ), die Matrixsynthese von glatten Muskelzellen hemmen¹.

Bei Plaqueruptur wird subendotheliale Matrix freigelegt, was Thrombozytenadhäsion und Aggregation verursacht. Arterieller Gefäßverschluss und Ischämie des nachgeschalteten Gewebes können die Folge sein. Thrombozyten spielen daher eine tragende Rolle für die Komplikation der fortgeschrittenen Atherosklerose, dem thrombotischen Gefäßverschluss¹³⁰.

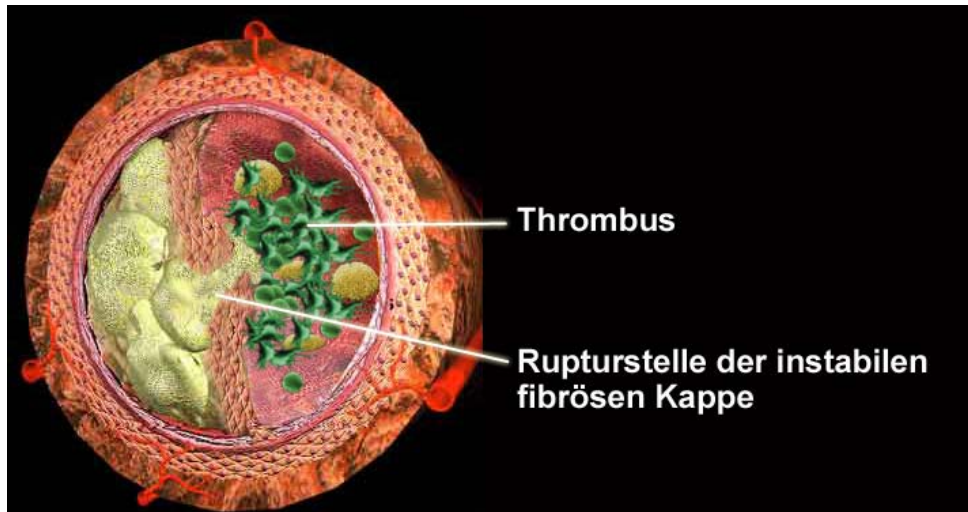


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Atherogenese: Ruptur der fibrösen Kappe

Verminderte Matrixsynthese der Muskelzellen und proteolytische Aktivität der Makrophagen können zu einer Ruptur der Kappe führen. An der Rupturstelle bildet sich ein Thrombus [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

2.3.3 Tiermodelle für Atherosklerose

Polygenetische Erkrankungen, bei denen mehrere Gene mit verschiedenen Umwelt-Einflüssen interagieren und so den klinischen Phänotyp ausprägen, sind durch *In-vitro*-Verfahren allein nicht zu erforschen. Tiermodelle helfen hier komplexe pathophysiologische Mechanismen aufzudecken⁷.

In der Atherosklerose-Forschung bediente man sich anfangs größerer Tierarten, wie Primaten, Schweinen oder Kaninchen¹⁰². Limitiert wurden diese Tiermodelle aber durch ihre genetische Variabilität sowie aufgrund aufwendiger Haltung und Zucht. Mäuse schieden zunächst aus, da sie sich als hoch resistent gegenüber atherosklerotischen Veränderungen erwiesen¹⁴

Heute stehen mehrere Mausmodelle zur Verfügung, die den Vorteil der geringen genetischen Varianz und der schnellen Zuchtfolge mit sich bringen^{7,102}. Diese Modelle, wie die Apolipoprotein E-defiziente Maus (im folgenden ApoE^{-/-}-Maus genannt) und die LDL-Rezeptor-defiziente Maus (LDL^{-/-}-Maus), wurden durch gezielte genetische Manipulation generiert¹⁶⁷.

ApoE^{-/-}-Mäuse weisen in der Entwicklung der Atherosklerose eine hohe Ähnlichkeit zu humanen Veränderungen auf¹²⁵. Der plasmatische Cholesterinspiegel ist, wie beim Menschen, von der Diät abhängig und durch eine lipid- und cholesterinreiche sogenannte „Western-type

diet“ steigerbar¹²³. Ein hoher Cholesterinwert erhöht den Grad an atherosklerotischen Veränderungen^{64,102,114}. Die Stadien des Gefäßumbaus sind denen des Menschen vergleichbar¹²³. Sie beginnen mit „Fatty Streaks“ und enden in fortgeschrittenen Läsionen mit der Bildung einer fibrösen Kappe^{102,125,167}. Instabile Plaques und Plaqueruptur konnten dagegen nicht oder nur selten beobachtet werden¹⁴.

Die ApoE^{-/-}-Maus ist ein häufig angewandtes und gut validiertes Mausmodell, bei dem die Apolipoprotein E-Synthese blockiert ist¹⁶⁷. Dieses Protein spielt eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel, ist Bestandteil von Plasmalipoproteinen und fungiert als hoch-affiner Ligand von Lipoproteinpartikeln. Somit beeinflusst das Protein den Transport und die Verteilung von Lipiden zwischen Organen und innerhalb eines Gewebes^{80,167}. Aus mehreren Gründen wird dem Apolipoprotein E antiatherogene Wirkung zugesprochen. Erstens beteiligt es sich an verschiedenen Prozessen der Beseitigung von Lipiden aus dem Plasma und des Cholesterinefflux aus peripheren Zellen. Zweitens besitzt es antioxidative Eigenschaften und reduziert möglicherweise die oxidative Modifikation von Lipiden⁶⁵. Drittens hat es Einfluss auf eine Reihe von Zellfunktionen, wie die Proliferation von Muskelzellen und die Lipoproteinaufnahme von Makrophagen^{80,81}.

In der vorliegenden Arbeit bietet das Mausmodell neben obig angegebenen noch einen weiteren Vorteil: aufgrund der umfassenden genomischen Aufschlüsselung ist es möglich, Mäuse durch genetische Manipulation zu verändern. Dies bietet uns in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit, ein Modell zu etablieren, welches die Analyse der Bedeutung der Thrombozyten in Initialstadien der Atherogenese ermöglicht. Durch gezielte genetische Veränderung und Zucht entsteht ein Mausmodell, welches neben der ApoE-Defizienz zusätzlich eine Defizienz des Glykoproteins GPIIb-IIIa aufweist, wodurch die GPIIb-IIIa-vermittelte feste Adhäsion von Thrombozyten am Endothel unterbunden wird. Beim Menschen tritt diese Plättchenfunktionsstörung, die „Glanzmann Thrombasthenie“ genannt wird, sehr selten auf. Untersuchungen des Ausprägungsgrades der Atherosklerose am Menschen konnten deshalb bisher nur in sehr geringem Maße durchgeführt werden¹⁴¹.

2.4 Glanzmann Thrombasthenie

2.4.1 Klinik der Glanzmann Thrombasthenie

Die Glanzmann Thrombasthenie ist eine autosomal rezessiv vererbte Plättchenfunktionsstörung, die durch eine fehlende oder verminderte Expression des GPIIb-IIIa in der Thrombozytenmembran hervorgerufen wird.

Sie wurde 1918 erstmals von Glanzmann beschrieben, der sie als hereditäre hämorrhagische Thrombasthenie bezeichnete^{5,44}.

Man unterscheidet mehrere Morbus Glanzmann Subtypen. Bei Typ 1 fehlt eine Expression des Rezeptors gänzlich, bei Typ 2 findet man bis zu 15% der normalen Anzahl an Rezeptoren an der Membranoberfläche. Zu den Morbus Glanzmann Varianten gehören auch diejenigen Patienten, bei denen der Rezeptorkomplex zwar vorhanden, aber funktionsgestört ist^{5,44}.

Im klinischen Bild stehen Schleimhautblutungen im Vordergrund, die sich vor allem in Form von Epistaxis darstellen. Spontane schwere Hämorrhagien sowie petechiale Blutungen sind dagegen selten. Lebensbedrohliche Blutungen können während der Menarche und nach Entbindung bzw. infolge von Traumen auftreten⁵.

Während die Plättchenzahl und -größe der Patienten physiologische Werte aufweisen, fehlt die Aggregation der Plättchen nach Kollagen- oder ADP-Stimulation. Die maximale Gerinnselfestigkeit zeigt sich im Thrombelastogramm vermindert^{5,44}.

2.4.2 Tiermodelle der Glanzmann Thrombasthenie

Der GPIIb-IIIa-Rezeptor besteht, wie bereits dargestellt, aus einer α_{IIb} -Kette und einer β_3 -Kette. Während erstere nur auf hämatopoetischen Stammzellen und Thrombozyten zu finden ist, bildet letztere in Kombination mit anderen Integrinen weitere Rezeptoren auf einer Vielzahl von Zellen⁴⁰. Daher ist bei einem Knock-out-Modell für thrombozytär bedingte Pathomechanismen die Defizienz der α_{IIb} -Kette (=GPIIb) vorzuziehen. Zwei derartige Knock-out-Modelle für Glanzmann Thrombasthenie wurden bisher vorgestellt. Tronik-Le Roux et al¹⁵³. zerstören das endogene GPIIb-Gen durch Insertion eines Thymidin-Kinase Gens. Emambokus et al.³³ dagegen erreichen den Knock-out, indem sie eine Sequenz, die ein GFP-Cre-Fusionsprotein kodiert, in das Allel einbringen. Letzteres Mausmodell wird in der Zucht der vorliegenden Dissertation verwendet. Aufgrund des Fehlens der GPIIb-Kette kann der GPIIb-IIIa-Komplex auf der thrombozytären Membran nicht exprimiert werden³³.

3 ZIELSETZUNG UND ZEITLICHER ABLAUF DER ARBEIT

3.1 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Es ist bekannt, dass Thrombozyten in Spätphasen der Atherosklerose eine zentrale Rolle spielen. Oberflächliche Erosion der Gefäßwand mit desquamierten Endothelzellen, Ruptur von Kapillaren in atherosklerotischen Läsionen und Ruptur der fibrösen Kapsel von Plaques führen zu einer Freilegung der subendothelialen Matrix und Aktivierung von Thrombozyten¹⁵⁵. Dies triggert den akuten, arteriellen thrombotischen Gefäßverschluss.

Vorangegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten *in vivo* zeigen, dass Thrombozyten nicht nur an subendothelialer Matrix, sondern auch am intakten Endothel prä-atherosklerotisch und atherosklerotisch veränderter Gefäße anhaften. Zudem war es möglich, den GPIIb-IIIa-Rezeptorkomplex als Mediator der festen Adhäsion in Regionen mit dysfunktionellem Endothel zu identifizieren^{51,85}.

Thrombozyten spielen nicht nur in hämostatischen Prozessen eine wichtige Rolle, sondern sind möglicherweise auch als inflammatorische Zellen zu begreifen. *In-vitro*-Studien konnten zeigen, dass Thrombozyten bei Aktivierung eine Reihe von proinflammatorischen Substanzen, wie Zytokine und Chemokine, in das Mikromilieu abgeben und so Interaktionen mit anderen Entzündungszellen vermitteln. Auch die Adhäsion von Blutplättchen am Endothel geht mit einer Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren einher^{11,85,90,91}.

Das Ziel des vorliegenden Projektes ist es nun, während der frühen Atherogenese den Einfluss proinflammatorischer Funktionen der Blutplättchen *in vivo* zu prüfen und die Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese der Atherosklerose zu definieren. Dazu wird im ersten Teil der Arbeit ein neues Tiermodell, die GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus, generiert und charakterisiert. Mäuse dieses Tiermodells entwickeln nicht nur atherosklerotische Läsionen, sondern weisen zusätzlich aufgrund der Defizienz des GPIIb-IIIa-Komplexes eine Thrombasthenie auf. Anhand des Tiermodells wird dann im zweiten Teil der Dissertation die von GPIIb-IIIa-vermittelte feste Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen untersucht und ihre Relevanz für die Atheroprogression evaluiert. Dazu analysiert man mithilfe der intravitralen Videofluoreszenzmikroskopie die Thrombozytendynamik an Prädilektionsstellen der Atherosklerose bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen. Zudem misst

man das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen mit duplexsonographischen und histomorphometrischen Verfahren.

3.2 Zeitlicher Ablauf und thematischer Aufbau der experimentellen Verfahren

Die für die vorliegende Arbeit erforderlichen GPIIb^{-/-}/C57Bl6/J Knock-out-Mäuse werden von der Arbeitsgruppe Prof. J. Frampton generiert³³ und für die im folgenden dargestellten Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Zu Beginn der Dissertation werden zunächst die GPIIb^{-/-}/C57Bl6/J-Knock-out-Mäuse in die ApoE^{-/-}/C57Bl6/J-Zucht eingekreuzt. Auf diese Weise erhält man GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Knock-out-Mäuse.

Im zweiten Teil der Studie vergleicht man GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse mit GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen (im weiteren Verlauf der Arbeit wird für GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäuse die gängige Bezeichnung ApoE^{-/-}-Mäuse verwendet). Alle Tiere erhalten ab einem Alter von 4 Wochen eine cholesterinreiche Diät. Nach Feststellung des Genotyps und Phänotyps werden die Mäuse in Gruppen eingeteilt, die in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung in der Übersicht

	GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}	ApoE^{-/-}	GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}	ApoE^{-/-}
	12 Wochen alt 8 Wochen Diät	12 Wochen alt 8 Wochen Diät	16 Wochen alt 12 Wochen Diät	16 Wochen alt 12 Wochen Diät
Männliche Tiere	n=6	n=6	n=6	n=6
Weibliche Tiere	n=3	n=3	n=3	n=3

Bei Erreichen des Alters von 12 und 16 Wochen wird die Aorta abdominalis der Mäuse duplexsonographisch untersucht. Am darauffolgenden Tag setzt man die experimentellen Verfahren fort.

Die Mäuse werden zunächst gewogen und anästhesiert. In Narkose entnimmt man den Tieren retrobulbär Blut, um den Hämatokrit, Hämoglobingehalt und Thrombozytenzahl bestimmen zu können. Anschließend bestimmt man die Blutungszeit der Tiere. Es folgt die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie und die intrakardiale Blutentnahme. Nach Tötung des Tieres wird eine Sektion durchgeführt und Organe entnommen, die der pathohistologischen Untersuchung zugeführt werden. Nach Entnahme des Aortenbogens und beider Aa. carotides

wird das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen evaluiert. Das intrakardial gewonnene Citratblut wird teils für die Thrombelastographie, teils für die Bestimmung des plasmatischen Cholesterinspiegels verwendet.

Neben diesen in Gruppen eingeteilten Mäusen fordert die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie zusätzlich Spendertiere gleichen Alters und Genotyps. Diesen entnimmt man unter Narkose intrakardial Blut und isoliert daraus Thrombozyten. Die Tiere werden nach Blutentnahme getötet.

Auch für eine durchflusszytometrische Analyse des thrombozytären Besatzes an Membranglykoproteinen ist die Gewinnung von Blut durch intrakardiale Entnahme nötig. Alle Untersuchungen werden in Tabelle 2 im Überblick gezeigt und in Abschnitt 4 detailliert beschrieben.

Tabelle 2: Der Versuchsablauf in der Übersicht

Alter	Narkose	Untersuchungsmethode	Ziel	Anzahl ausgewerteter Tiere/Gruppe
4 Wo	ja	Ohrmarkierung	Identifikationsmöglichkeit des Einzeltieres	alle gezüchteten Tiere
		Trennung vom Muttertier und Beginn der cholesterinreichen Diät	Akzeleration der Atherogenese durch Nachahmung fettreicher Diät des westlichen Kulturkreises	alle in Versuche eingeteilte Tiere
	ja	Kappen der Schwanzspitze	Gewebeprobe für PCR; Vollblut für Durchflusszytometrie	alle gezüchteten Tiere
		PCR	Feststellung des Genotyps	alle gezüchteten Tiere
		Durchflusszytometrie im Vollblut	Immunophänotypisierung	alle gezüchteten Tiere
		Gruppeneinteilung		n = mind. 9
12 bzw. 16 Wo	ja	Duplexsonographie	Bestimmung der Rigidität der Gefäßwand	n = 9
	ja	Retrobulbäre Blutentnahme	Bestimmung der Werte: PLT, HB, HKT	n = 7
	ja	Blutungszeit an Schwanzspitze	Nachweis der Blutgerinnungsstörung	n = mind. 7
	ja	Fluoreszenz-Intravitalmikroskopie	Analyse der Thrombozyten-Dynamik an atherosklerotisch veränderten Gefäßen	n = 6 (je 2 Aa. carotides comm.)
		Messung des plasmatischen Cholesteringehaltes	Nachweis der vergleichbaren Aufnahme der cholesterinreichen Diät	n = 7
		Rotationsthrombelastogramm	Analyse der Funktionalität der Thrombozyten	n = mind. 4
		Sektion (Bericht + Photos)	Darstellung und Dokumentation pathologischer Befunde	n (insg.) = 18
		Organentnahme	s.u.	n = 40
		Sudan-III-Färbung des Aortenbogen und der linken A. carotis communis	En-face Analyse der Plaquegröße	n = 9
		E.v.G.-Färbung serieller Querschnitte der rechten A. carotis communis	Histomorphometrische Analyse der Plaquegröße	n = 7
	HE-, Kongorot-, u. E.v.G.-Färbung der Organe; PAS und BBS	Histopathologische Untersuchung	n (insg.) = 19	

E.v.G.-Färbung: Elastica-van Giesson-Färbung

BBS: Berliner-Blau-Reaktion

HB: Hämoglobingehalt

HE-Färbung: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HKT: Hämatokrit

M.: Mäuse

PAS: Perjodsäure-Schiff-Reaktion

PCR: Polychain reaction

[Aus der Tabelle ausgenommen ist die nicht in den Versuchsablauf eingegliederte durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression thrombozytärer Rezeptoren im PRP].

4 UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODEN

4.1 Wahl und Durchführung der Narkose

Für die Gewinnung einer Gewebe- und Blutprobe bei Genotypisierung und Phänotypisierung der Tiere, für die intrakardiale Blutentnahme, gleichwie für die etwa 10-minütige, nicht schmerzhaft duplexsonographische Untersuchung werden die Tiere durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (CuraMED, Karlsruhe) und Sauerstoff anästhesiert.

Alle weiteren Eingriffe am Tag der Opferung umfassen einen Zeitraum von 2 bis 3 Stunden und laufen innerhalb einer Narkose ab, die bis zur Tötung des Tieres andauert. Die Anästhesie wird durch Inhalation von Isofluran und Sauerstoff eingeleitet. Danach appliziert man eine Kombinationsanästhesie aus 0,15mg/kg Midazolam (CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 15µg/kg Medetomidin (Domitor[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe) und 1,5µg/kg Fentanyl (CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) intraperitoneal. Diese Injektionsnarkose sichert die chirurgische Toleranz während des Ablaufs der Versuche. Puls- und Atemfrequenz, Atemtyp und das Fehlen des Flexorreflexes überprüft man in regelmäßigen Abständen. Über eine Nasenmaske wird die Oxygenierung des Tieres sichergestellt.

Eine Wärmematte (Fa. Dehner) sorgt für die Homothermie des narkotisierten Tieres.

4.2 Zucht und Haltung der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-und ApoE^{-/-}-Mäuse

ApoE-defiziente Mäuse stellen ein bekanntes Tiermodell in der Atherosklerose-Forschung dar, die im zeitabhängigen Verlauf dem Menschen ähnliche atherosklerotische Läsionen entwickeln¹²³. ApoE^{-/-}-Mäuse, die auf dem GPIIb-Lokus Wildtyp-Allele aufweisen, werden in der vorliegenden Arbeit mit GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen verglichen. Bei der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus handelt es sich um eine Erweiterung des bekannten Tiermodells für Atherosklerose, da sie aufgrund des Verlustes des thrombozytären Oberflächenrezeptors GPIIb-IIIa eine Thrombasthenie mit gestörter Adhäsivität der Thrombozyten an Endothelzellen aufweisen.

4.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere werden insgesamt 34 GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse und 28 ApoE^{-/-}-Mäuse (C57Bl/6J-Apo^{Etm1Unc}) aus eigener Zucht verwendet.

Die Mäuse werden alle in Gruppen bis zu 6 Tieren in Käfigen vom Makrolon-Typ II (Ehret GmbH, Emmendingen) gehalten. Entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat dient als Einstreu, das zweimal wöchentlich gewechselt wird. Außerdem bietet man den Tieren sterilisierten Zellstoff als Nestbaumaterial und Kriechröhrchen aus Pappe. In der Behausung beträgt die Raumtemperatur bei konstanter Entlüftung 20 bis 25°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70%. Eine Beleuchtungsanlage sorgt für einen geregelten Hell-Dunkel-Rhythmus, wobei in der Hell-Phase 50-100 Lux im Käfig erreicht werden. Frisches Wasser und Futter steht den Tieren ad libitum zur Verfügung. Alle Versuchstiere (mit Ausnahme der Tiere, die in der Zucht eingesetzt werden) erhalten eine cholesterinreiche Diät (Altromin, Lage). Die Zusammensetzung der Diät ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Liste der Inhaltsstoffe des cholesterinreichen Futter

Zusammensetzung	g/kg Futter
Purina Maus Futter, 5015, gemahlen	750
Kasein	75
Dextrose	30
Sucrose	16,25
Dextrin	16,25
Kakao Butter	75
Cholesterin	12,5
Cellulose	12,5
Mineral Mix, AIN-76 (170915)	8,75
Vitamin Mix, Teklad (40060)	2,5
Cholinchlorid	1,25

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

4.2.2 Durchführung der Mäusezucht

Die Zucht der ApoE^{-/-} Mäuse

Die Zucht der ApoE^{-/-}-Mäuse (C57Bl/6J-Apo^{Etm1Unc}) (Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine, USA) beginnt mit kommerziell erworbenen Elternpaaren. Da diese Knock-out-Mäuse fertil sind, ist eine Verpaarung möglich, und es bleibt das defiziente ApoE-Allel bei den Nachkommen homozygot erhalten. Nach Verpaarung der Elterntiere werden die Zuchtböcke aus den Käfigen entfernt, um den trächtigen Weibchen eine ruhige Geburt und erfolgreiche Aufzucht der Jungtiere zu ermöglichen. Nach 4 Wochen werden die Jungmäuse abgesetzt. Nach einwöchiger Ruhepause verpaart man Weibchen, die sich in gutem Gesundheitszustand befinden, erneut.

Einkreuzung der GPIIb^{-/-}C57Bl/6J Maus in die ApoE^{-/-}C57Bl/6J Maus

Ausgangspunkt der Einkreuzung sind zwei GPIIb^{-/-}C57Bl/6J Zuchtböcke der Arbeitsgruppe von Prof. J. Frampton (University of Oxford, Department of Pharmacology, United Kingdom)³³, die man mit ApoE^{-/-}C57Bl/6J Weibchen verpaart. Nachkommen aus dieser Verpaarung sind sowohl auf dem Genlocus GPIIb, als auch auf dem Genlocus ApoE heterozygot. Diese F1-Generation ist also, wie es das 1. Mendel'sche Gesetz voraussagt, phänotypisch (aber auch genotypisch) uniform (siehe Tab.4).

Tabelle 4: Uniforme Merkmalsverteilung in der F1-Generation

?	G a	G a
?	GgAa	GgAa
g A	GgAa	GgAa

Zeichenerklärung:

G: Allel mit aktivem GPIIb-Gen
 A: Allel mit aktivem ApoE-Gen

g: Allel mit inaktiviertem GPIIb-Gen
 a: Allel mit inaktiviertem ApoE-Gen

Eine Kreuzung von Individuen der F1-Generation führt zu einer Aufspaltung des Genotyps mit dem Verhältnis 1:2:1. In dieser F2-Generation erhält man also die ersten zweifach defizienten Nachkommen, die innerhalb dieser Arbeit als GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse bezeichnet werden (siehe Tab.5).

Tabelle 5: Aufspaltung des Genotyps in der F2-Generation im Verhältnis 1:2:1

?	G a	G a
G A	GGAA	GgAa
g a	GgAa	<u>ggaa</u>

Zeichenerklärung:

G: Allel mit aktivem GPIIb-Gen

g: Allel mit inaktiviertem GPIIb-Gen

A: Allel mit aktivem ApoE-Gen

a: Allel mit inaktiviertem ApoE-Gen

unterstrichener Genotyp: erwünschter Genotyp

Da sich die defizienten Tiere phänotypisch nicht deutlich von den nicht defizienten Tieren unterscheiden, ist zu diesem Zeitpunkt der Zucht die Bestimmung des Genotyps der Jungtiere nötig. In der hier beschriebenen Zucht von doppelt defizienten Tieren bietet sich zusätzlich eine Analyse der Expression des thrombozytären GPIIb-IIIa-Rezeptors an. Die Abschnitte 4.2.3 und 4.2.4 gehen genauer auf die Wahl und die Durchführung dieser Methoden ein.

Nach der Genotypisierung versucht man eine Verpaarung von Männchen und Weibchen aus der F2-Generation, die sich auf beiden Genloci als negativ erweisen. Bei der daraus entstehenden F3-Generation können dann nur noch doppelt defiziente Individuen auftreten. Doch Hämorrhagien während und nach der Geburt bei doppelt defizienten Mäusen erfordern eine Zucht mit heterozygoten Zuchtweibchen. Die männlichen Tiere sind durch die Thrombasthenie in ihrer Fruchtbarkeit unbeeinträchtigt, ihre Verwendung als Zuchtböcke ist deshalb möglich. Daraus ergibt sich ein Zuchtschema, das in der folgenden Tabelle (Tab.6) übersichtlich dargestellt wird.

Tabelle 6: Schema des angewendeten Zuchtmodus

?	G a	G a
g a	Ggaa	<u>ggaa</u>
g a	Ggaa	<u>ggaa</u>

Zeichenerklärung:

G: Allel mit aktivem GPIIb-Gen

g: Allel mit inaktiviertem GPIIb-Gen

A: Allel mit aktivem ApoE-Gen

a: Allel mit inaktiviertem ApoE-Gen

unterstrichener Genotyp: erwünschter Genotyp

Wie man der obigen Tabelle entnehmen kann, hat nur 50% der Nachkommenschaft den erwünschten Genotyp. Für die Selektion dieser Tiere ist eine Bestimmung des Genotyps und des Phänotyps unerlässlich (siehe Abschnitt 4.2.3 und 4.2.4).

Erschwerend auf die Produktion einer Nachkommenschaft wirkt sich die Subletalität der Rezeptordefekte bei doppelt defizienten Tieren aus.

So versterben in einem Zeitraum von 5 Monaten, in welchem insgesamt 51 geborene Jungtiere registriert werden, 20 Nachkommen. 16 davon sind doppelt defiziente Jungtiere.

4.2.3 Genetische Identifikation der Doppel-Knock-out-Mäuse durch PCR und Gelelektrophorese

Bei den Zuchtlinien der ApoE^{-/-}-Mäuse und der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse wird eine Genotypisierung unter Verwendung von PCR und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Da in der zuerst aufgeführten ApoE^{-/-}-Zuchtlinie homozygote Tiere miteinander gepaart werden, ist eine Variation des Genotyps sowohl auf dem ApoE-Lokus, als auch auf dem GPIIb-Lokus nicht zu erwarten. Eine stichprobenartige Untersuchung des Genotyps alle 2 Monate bei 10 Tieren aus unterschiedlichen Würfen reicht aus, um mit großer Sicherheit eine Aussage zu dem Genotyp des Einzelindividuums treffen zu können.

Bei der Zuchtlinie der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse kann für den ApoE-Lokus obig beschriebenes Verfahren eingesetzt werden. Bei jedem einzelnen Tier muss jedoch der GPIIb-Lokus überprüft werden, da zu erwarten ist, dass die Hälfte der Individuen Heterozygotie aufweist. Da die obligatorische Genotypisierung des GPIIb-Lokus die Gewinnung einer Gewebeprobe von jedem Tier dieser Zuchtlinie voraussetzt, bietet sich auch eine häufigere Überprüfung des ApoE-Lokus aus derselben Gewebeprobe an.

Gewinnung der Gewebeprobe

Unter Isofluran-Inhalationsnarkose schneidet man etwa 8 mm der Schwanzspitze ab und koaguliert die Wundfläche mit einem Silbernitrat Ätzstift (ryma-pharm, Körle). Gleichzeitig werden die Tiere an den Ohren individuell markiert.

DNA-Isolation:

Die Isolation der genomischen DNA aus den Gewebeproben erfolgt mithilfe des DNeasy™Tissue Kits 250 (Quiagen GmbH, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

Amplifizierung der zu bestimmenden Gensequenzen:

Mit PCR werden die zu untersuchenden Gensequenzen vervielfacht. Angaben zu der Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze kann den Tabelle 7 und Tabelle 8 entnommen werden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 und Tabelle 10, die gewählten PCR Bedingungen in Tabelle 11 aufgelistet.

Es werden 25µl je Reaktionsgefäß angesetzt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz (25µl) für die Amplifizierung des GPIIb -Gens

Substanzen	Menge	Hersteller
10xPCR Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	2,5µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,25µl [1,25units/Ansatz]	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTP-Mix (10mM)	0,5µl [200µM]	Promega, Madison, Wi,USA
Primer Cre fw. und Cre rev.	je 0,75µl [je 03µM]	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer GPIIb fw.und GPIIb rev	je 0,75µl [je 03µM]	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Template DNA (ca 100ng)	3µl	
Aqua bidest	17,25µl (ad 25µl)	

Tabelle 8: Reaktionsansatz (25µl) für die Amplifizierung des ApoE- Gens

Substanzen	Menge	Hersteller
10xPCR Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	2,5µl	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,25µl [1,25units/Ansatz]	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTP-Mix (10mM)	0,5µl [200µM]	Promega, Madison, Wi,USA
Primer oIMR180	0,75µl [0,3µM]	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer oIMR181	0,75µl [0,3µM]	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer oIMR182	0,75µl [0,3µM]	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Template DNA (ca.100ng)	0,25µl	
Aqua bidest	Ad 25µl	

Tabelle 9: Primer der PCR-Ansätze (GPIIb - Lokus)

Primer für den GPIIb-Lokus		Primer-Sequenzen
PR 116	Cre forward	TCGATGCAACGAGTGATGAG
PR 117	Cre reverse	TTCGGCTATACGTAACAGGG
PR 118	GPIIb wt reverse	TCTGCCTAACTCtGTCTTCC
PR 119	GPIIb wt forward	CAGACTCCTGGCTCATCTAC

Tabelle 10: Primer der PCR-Ansätze (ApoE - Lokus)

Primer für den ApoE-Lokus		Primer-Sequenzen
PR59	oIMR180	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG
PR61	oIMR181	TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC
PR60	oIMR182	GCCGCCCGACTGCATCT

Tabelle 11: Übersicht über die PCR Bedingungen für 35 Zyklen

	PCR Bedingungen für GPIIb	PCR Bedingungen für ApoE
Initiale Denaturierung	5` bei 95°C	5` bei 95°C
Denaturierung	45` bei 95°C	45` bei 95°C
Primerbindung	45` bei 55°C	5` bei 62°C
Elongation	45` bei 72°C	45` bei 72°C
Termination	7` bei 72°C bei 4°C bis Entnahme der Proben	2` bei 72°C bei 4°C bis Entnahme der Proben

Auftrennung der Banden: Die Auftrennung der Banden erfolgt auf frisch hergestelltem 2% Agarosegel, das als Gelträger in einer Flachbettkammer der Gelelektrophorese-Zelle liegt.

Beschicken des Gels und Gelelektrophorese: Vor dem Beschicken des Gels werden 25µl der amplifizierten DNA mit 5µl des 5x High Density TBE Sample Buffers (Invitrogen™LifeTechnologies, Carlsbad, California, USA) vermischt. Jeweils 20µl dieser Lösung werden aufgetragen. Außerdem gibt man 3µl des 5x High Density Buffers zu 2µl DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, Indiana, USA) und 10µl Aqua bidest. und pipettiert dies gesamt in das erste Loch im Gel.

Für die Gelelektrophorese günstig erweist sich ein Lauf von 45 Minuten mit einer angelegten Spannung von 110 Volt.

Dokumentation: Nach Abschluss der Gelelektrophorese werden die Gele abfotografiert und die Ergebnisse in Zuchtlisten eingetragen.

4.2.4 Durchflusszytometrische Immunophänotypisierung

Die Ergebnisse der Genotypisierung werden über die Feststellung des Phänotyps überprüft. Dazu verwendet man eine durchflusszytometrische Methode.

Durch den Knock-out des GPIIb-Lokus ist ein Fehlen des Glykoprotein GPIIb-IIIa-Komplexes auf der Oberfläche der Blutplättchen zu erwarten. Um die fehlende Expression der Integrinkette nachweisen zu können, bedient man sich der Durchflusszytometrie. Mit dieser Methode können Einzelzellen, die mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt worden sind, identifiziert und die Expression von Antigenen untersucht werden. Spezielle Photodioden registrieren das Streulicht und die Intensität der fluorochrommarkierten Zelle, die im konstanten Fluss durch eine Kanüle geführt und dort von einem Laserstrahl angeregt werden. Dadurch kann die Größe und Granularität der Zelle und die Oberflächenexpression von Antigenen bestimmt werden. Für die automatisierte Messung stehen Geräte zur Verfügung, wie in unserem Fall das FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, California, USA).

Für die Bestimmung der Expression des Glykoproteins GPIIb-IIIa bedient man sich der „Zweifarb“-Vollblutmethode, die erstmals von Shattil und Mitarbeitern 1987 vorgestellt wurde⁴⁰. Dazu gewinnt man beim Absetzen der Schwanzspitze (bei der Gewinnung einer Gewebeprobe für die DNA-Isolation) 3µl ungerinnbares Blut und gibt dies in ein 1,5µl Eppendorf-Reaktionsgefäß. Nach Zugabe von 197µl PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4, von Invitrogen, Karlsruhe), überführt man 40µl des Gemisches in ein FACS-Röhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht). Danach färbt man jede Probe mit zwei verschiedenen fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlichem Lichtfrequenzspektrum. Dazu verwendet man 1µg/Ansatz (5µg/ml) des Antikörpers Phycoerythrin (PE)-anti-mouse CD61 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg), der eine rote Fluoreszenz im Absorptionsbereich von 492nm und eine Emission von 580nm aufweist und sich gegen die β_3 -Kette des Glykoprotein GPIIb-IIIa-Komplexes richtet. Zusätzlich markiert man die

Thrombozyten mit 2,5µg des Fluoreszin-Isothiocyanat-(FITC)-anti-mouse-CD41-Antikörpers (12,5µg/ml), der sich durch eine geringere Wellenlänge im Bereich der Absorption und Emission auszeichnet und gegen die α_{IIb} -Kette des Glykoprotein GPIIb-IIIa-Komplexes gerichtet ist. Nach einer Inkubation von 30 Minuten in Dunkelheit und bei Raumtemperatur fixiert man den Inkubationsansatz mit 0,5% Paraformaldehyd/PBS-Lösung.

In der anschließenden durchflusszytometrischen Messung werden zunächst die Thrombozyten über ihre Größe und spezifische Fluoreszenz, die aufgrund der Markierung mit dem PE-Antikörper besteht, identifiziert. Danach wird die Intensität der Fluoreszenz des FITC-Antikörpers auf der Blutplättchenoberfläche geprüft.

Die hier verwendete „Zweifarb“-Vollblutmethode mit einem geringen Blutvolumen von 3µl erlaubt die Identifizierung GPIIb-IIIa-defizienter Mäuse. Da der Blutstropfen nach dem Kappen der Schwanzspitze für die Genotypisierung direkt aufgenommen wird, stellt diese Methode eine schonende Möglichkeit der Immunphänotypisierung dar. Sie eignet sich aber nicht für die genauere Analyse des Besatzes an thrombozytären Oberflächenrezeptoren, wie sie im Abschnitt 4.3.1 beschrieben ist.

4.3 Charakterisierung der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus

Die GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus stellt eine Kombination des Tiermodells der ApoE^{-/-}-Maus für Atherosklerose und des Tiermodells für Glanzmann Thrombasthenie dar. Durch den Gendefekt auf dem GPIIb-Lokus wird die Expression des thrombozytenspezifischen GPIIb-IIIa-Rezeptors unterdrückt. Wie eingangs bereits dargestellt ist das GPIIb-IIIa von herausragender Bedeutung für die Thrombozytenadhäsion an das dysfunktionelle Endothel in frühen Stadien der Atherogenese. Das Modell der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus ermöglicht es, die Rolle der Thrombozyten in der Atherosklerose genauer zu untersuchen, noch bevor Endothelläsionen in atherosklerotisch veränderten Bereichen auftreten.

Um den Phänotyp des neuen Tiermodells, die GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus, zu charakterisieren, werden unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Die Analyse des thrombozytären Rezeptorbesatzes erfolgt mithilfe der Durchflusszytometrie. Die Messung der Blutungszeit, sowie die Durchführung einer Thrombelastographie beschreibt die Hämostase der Knock-out-Mäuse. Die Bestimmung verschiedener Blutparameter, Sektion und histopathologische Untersuchungen sollen die klinische Symptomatik des Tiermodells klären.

4.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der Rezeptorlandschaft GPIIb-defizienter Blutplättchen

Rezeptoren können sich in der Anzahl ihrer Expression an der Zelloberfläche gegenseitig beeinflussen. Da das GPIIb-IIIa-Glykoprotein mit etwa 50000 bis 80000 Rezeptoren/Thrombozytenoberfläche das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein darstellt^{20,157}, ist eine Verschiebung der Vorkommenshäufigkeit anderer Oberflächenrezeptoren denkbar. In der Analyse werden in ihrer Expression häufige und funktionell wichtige Oberflächenrezeptoren, nämlich das Glykoprotein GPIb-V-IX, das Glykoprotein GPVI, P-Selektin und das Glykoprotein GPIIb-IIIa auf den Grad der Expression hin überprüft.

4.3.1.1 Versuchsprotokoll

Auch in diesem Versuch werden GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse den ApoE^{-/-}-Mäuse gegenübergestellt. Anders als in den sonst genannten Versuchen sind diese Tiere aber in die übrigen Verfahren des Versuchsablaufes nicht eingebunden. Das Prinzip der Analyse entspricht dem der durchflusszytometrischen Bestimmung des Glykoproteins GPIIb-IIIa aus Vollblut (siehe 4.1.4), man arbeitet hier aber mit plättchenreichem Plasma (PRP).

Jeweils zwei Mäuse des Genotyps GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} werden anästhesiert und für die intrakardiale Blutentnahme vorbereitet. Nachdem etwa 1,5ml Citratblut abgenommen wurde, tötet man die Tiere.

Aus dem Citratblut gewinnt man durch Zentrifugation (15min, 700rpm) plättchenreiches Plasma. Man bereitet insgesamt 10 Ansätze (5 verschiedene Färbungen, doppelt bestimmt) mit jeweils 5µl Plasma in FACS-Röhrchen vor und pipettiert die fluorochrommarkierten Antikörper hinzu. Das Reaktionsvolumen wird mit PBS-Puffer auf 50µl erhöht. Für die Markierung verwendet man die in Tabelle 12 aufgelisteten Antikörper; Isotypantikörper und ungefärbte Ansätze dienen als Kontrolle.

Tabelle 12: Liste der verwendeten Antikörper

Membranprotein	Antikörper	Dosierung
GPIIb (GPIIb-IIIa-Komplex)	Anti-CD41-FITC	0,2mg/ml
GPIIIa (GPIIb-IIIa-Komplex)	Anti-CD61-PE	0,2mg/ml
P-Selektin	Anti-CD62P-FITC	0,2mg/ml
GPVI	JAQ-1-FITC	0,2mg/ml
GPIb-V-IX	Anit GpIb + Anti-Ratte-FITC	0,2mg/ml
Isotypenkontrolle	Anti-CD61-PE Iso	0,2mg/ml
Isotypenkontrolle	Anti-Maus IgG-FITC	0,2mg/ml

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit fixiert man den Ansatz mit 450µl 0,5% Paraformaldehyd/PBS-Lösung und beginnt mit der Messung. Zunächst identifiziert man am Gerät (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, California, USA) die Zellpopulation der Thrombozyten mithilfe der Größe und Granularität der Blutplättchen. Danach misst man den Wert der Eigenfluoreszenz der Thrombozyten. Es folgt die Messung der Fluoreszenz der markierten Proben von GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen. Dabei wählt man eine Geräteeinstellung, bei der jeweils 10000 Zellen pro Ansatz gemessen werden. Der Medianwert der Fluoreszenz pro Ansatz kann am Gerät abgelesen werden und dient in der Auswertung als Parameter für den Grad der Expression eines Antikörpers an der Oberfläche des Blutplättchens.

4.3.2 Bestimmung der Blutungszeit

Zusätzlich misst man am narkotisierten Tier die Blutungszeit nach einer von Law et al.⁷³ beschriebenen und modifizierten Methode. Dazu schneidet man mit einem sterilen Skalpell 1mm des Schwanzendes ab. Die natürliche Schwanzspitze der Tiere fehlt zu diesem Zeitpunkt, da sie als Gewebeprobe für die Genotypisierung bereits gekappt wurde. Nun wird mit einem saugenden Filterpapierchen (MN Glasfaserfilter, Machery-Nagel GmbH, Düren) jede volle Minute der sich bildende Blutstropfen abgetupft, ohne Druck auf die Schnittfläche auszuüben.

Die Blutungszeit wird 20min lang gemessen. Ist zu diesem Zeitpunkt eine Blutstillung nicht erfolgt, koaguliert man die Gefäße, um einen weiteren Blutverlust zu verhindern.

4.3.3 Funktionelle Evaluierung der Hämostase mittels Thrombelastographie

Die Rotationsthrombelastographie zählt zu den sogenannten viskoelastischen Methoden, die während der Hämostase kontinuierlich die Gerinnselfestigkeit aufzeichnet^{53,163}.

Diese Methode gibt Aufschluss über Gerinnungszeit, Dynamik der Gerinnselfestigkeit, maximale Gerinnselfestigkeit und Gerinnselfestigkeit bzw. -fibrinolyse und erlaubt damit eine funktionelle Evaluierung der Hämostase.

Jeweils 8 Tiere der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe werden getestet.

Wie in 4.5.1 noch genau beschrieben, entnimmt man dem Versuchstier intrakardial Blut. Dabei ist darauf zu achten, dass ein Vollblut/Citrat-Verhältnis von 10:1 vorliegt. Dies kann man erreichen, indem man in eine Einmalspritze 100µl Citrat (aus S-Monovetten; Sarstedt AG&Co, Nümbrecht) vorlegt. Gewinnt man mehr Blut, pipettiert man sofort nach der Blutentnahme die fehlende Menge an Citrat hinzu. Ein Teil des Vollblutes wird für die Herstellung von Plasma verwendet (siehe Cholesterinbestimmung), der andere Teil (mindestens 350µl) wird der thrombelastographischen Messung zugeführt.

Nach der Anleitung des Herstellers (Pentapharm GmbH, München) wird zunächst das Citratblut mit Calciumchlorid (STARTEG, Pentapharm GmbH, München) rekalkifiziert. Durch Zugabe von Thromboplastin (EXTEG L, Pentapharm GmbH, München) aktiviert man dann das extrinsische Gerinnungssystem. Dabei wird die Kurve der Gerinnselfestigkeit kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Auswertung des Thrombelastogramms konzentriert sich auf drei Werte. Die Gerinnungszeit (CT) umfasst die Zeitspanne vom Startzeitpunkt bis zum Beginn einer deutlich einsetzenden Gerinnselfestigkeit. Die Gerinnungszeit endet, wenn die Amplitude der aufgezeichneten Kurve den Wert von 2mm überschreitet.

Die Gerinnselfestigkeitszeit (CFT) bezeichnet die Zeitspanne bis zum Erreichen einer Amplitude von 20mm. Sie wird durch einen Farbwechsel in der Kurvendarstellung markiert.

Die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) spricht die maximale Festigkeit an, die das Gerinnselfestigkeit während der Messung erreicht, und spiegelt sich in der maximalen vertikalen Ausdehnung der Thrombelastogrammkurve wieder.

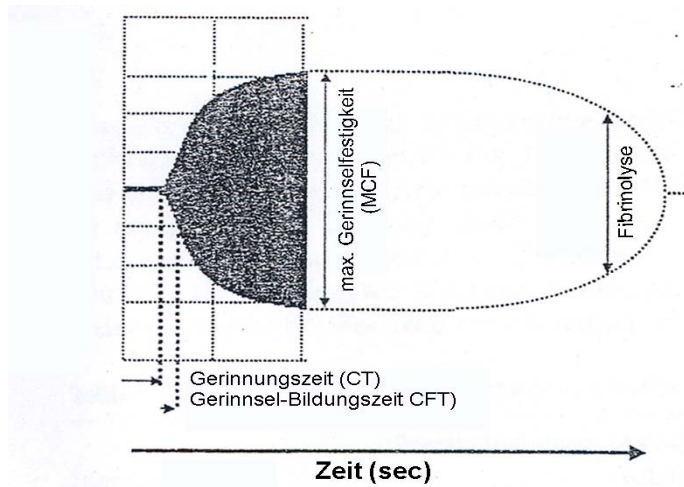


Abbildung 9: Beispiel eines Thrombelastogramms mit Messparameter

modifiziert nach: Calatzis et al.¹⁶

4.3.4 Kontrolle der Blutparameter

Da in den zu beschreibenden Mäusen eine Thrombopathie zu erwarten ist, erscheint es sinnvoll, Blutparameter zu bestimmen, die Hinweise auf eine mögliche Blutungsneigung geben können. Aufgrund der geringen Blutmenge, die den Mäusen entnommen werden kann und zudem auch noch für andere Untersuchungen benötigt wird, beschränkt man sich auf die Bestimmung der Thrombozytenzahl (PLT), des Hämoglobingehaltes (Hb) und des Hämatokrits (Hkt).

100µl heparinisiertes Blut werden am narkotisierten Tier, das für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet wird, retrobulbär entnommen. Die Blutparameter werden automatisiert gemessen (Sysmex XE-2100, SYSMEX DEUTSCHLAND GmbH, Norderstedt) und die Ergebnisse in vorgelegte Tabellen eingetragen. Die retrobulbäre Blutentnahme wird trotz später erfolgender intrakardialer Blutentnahme durchgeführt, da die zur Verfügung stehenden Geräte die Messung der Blutparameter bei geringen Blutvolumina nur mit heparinisiertem Blut erlauben. Untersuchungen, wie die Thrombelastographie, setzen aber Citratblut voraus.

4.3.5 Sektion der Tiere

Bei 28 der im Versuch eingesetzten Tiere wird nach Tötung eine Sektion durchgeführt. Ziel der Sektionen ist es, mehr über die Auswirkungen der Gendefekte zu erfahren. Gewicht, Alter, Geschlecht, Genotyp und Gruppenzugehörigkeit der Tiere werden, wie auch alle in der Sektion erhobenen Befunde, vermerkt. Man arbeitet mit einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss, Göttingen), um kleine Strukturen beurteilen zu können. Während der Sektion werden Organe entnommen und später histopathologisch untersucht. Hierbei handelt es sich um Anteile der Lunge, der Leber und des Darms. Das Herz, die Milz, die Nieren und ein Femurknochen werden in ihrer Gesamtheit entnommen. Die Befunde der Sektion dokumentiert man mit digitalen Fotos (Nikon Coolpix 995; Nikon GmbH, Düsseldorf). Auch Tieren, bei denen aus zeitlichen Gründen während des Versuchsablaufs eine Sektion nicht möglich gewesen ist, werden die Organe entnommen.

4.3.6 Histopathologische Untersuchungen

Im Anschluss an die Sektionen sollen die histopathologischen Untersuchungen das klinische Bild der Rezeptordefekte des Tiermodells beschreiben.

Bei 19 Tieren unterschiedlicher Gruppenzugehörigkeit (Einzelheiten siehe 5.2.6) wird eine histopathologische Untersuchung vorgenommen. Nach Entnahme der Organe (Lunge, Leber, Milz, Niere, Darm und Knochenmark eines Femurschaftes) werden diese 24 Stunden in 4,5%Formaldehyd fixiert. Danach bereitet man nach bekanntem Verfahren¹²⁸ die Proben zur Einbettung in Paraffinblöcke vor. 1µm dicke Schnitte werden an einem Rotationsmikrotom (Microtom HM 335 E, MICROM GmbH, Walldorf) angefertigt. Für jedes Organ werden sowohl Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte angefertigt, als auch ein Hämosiderin-Nachweis mit der Berliner-Blau-Reaktion durchgeführt. Die Niere wird zusätzlich mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) gefärbt, die Lunge außerdem in der Elastica-van-Giesson-Färbung und Kongorot-Färbung evaluiert.

4.4 Die Kinetik der Thrombozytenadhäsion

Die feste Adhäsion von Blutplättchen an dysfunktionellen Endothelzellen wird von dem thrombozytären Glykoprotein GPIIb-IIIa vermittelt, das über von-Willebrand-Faktor und Fibrinogen an endotheliale Rezeptoren binden kann^{11,129}. In GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen ist daher eine andere Dynamik der Thrombozyten im Bereich von atherosklerotisch alterierten Gefäßen zu erwarten, als in ApoE^{-/-}-Mäusen. Durch die verschiedenen Altersgruppen in dem vorliegenden experimentellen Vorhaben lassen sich unterschiedliche Stadien der atherosklerotischen Veränderung im Hinblick auf das Verhalten der Thrombozyten untersuchen.

Zur Beurteilung der Kinetik der Thrombozytenadhäsion bedienen wir uns der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie. Sie ermöglicht es, die Thrombozyten-Endothelzellen-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen und die feste Adhäsion der Blutplättchen quantitativ zu analysieren.

4.4.1 Prinzip der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie

Die Technik der Epifluoreszenzmikroskopie erlaubt es, Zellen, die mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, *in vivo* zu untersuchen. Sie basiert darauf, dass Fluorophore kurzwelliges Anregungslicht absorbieren und als langwelligeres Licht wieder emittieren. In der vorliegenden Arbeit werden die Blutplättchen mit dem Farbstoff DCF (2,7-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, Fa. Molecular Probes, USA) markiert. Bei diesem Farbstoff liegt das Exzitationsspektrum bei einer Wellenlänge von 513nm, die Wellenlänge des emittierten Lichtes bei 532nm.

Durch die Wahl spezifischer Filter kann das Epifluoreszenzmikroskop auf bestimmte Spektrallichtbereiche eingestellt werden. Es trifft also nur kurzwelliges Licht auf die markierten Zellen. Sperrfilter vor einer Kamera lassen wiederum nur langwelliges, emittiertes Licht im Bereich von ca. 532nm passieren, löschen also störendes Restanregungslicht aus.

4.4.2 Aufbau des Arbeitsplatzes

Der Aufbau des Arbeitsplatzes lässt sich in drei Einheiten unterteilen (siehe Abb.10). Die erste Einheit sichert die Versorgung der narkotisierten Maus. Sie besteht im Wesentlichen in einer Nasenmaske und einer Narkoseeinrichtung, die das Versuchstier zur besseren Oxygenierung mit Sauerstoff versorgt und bei Bedarf eine zusätzliche Isofluran-Inhalation erlaubt. Eine Wärmematte (Fa. Dehner) hält die Körpertemperatur der Maus konstant. Die zweite Einheit erlaubt die optische Erfassung. Sie besteht aus dem Epifluoreszenzmikroskop (Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop, Axiovert 100HD, Fa Zeiss, Göttingen), der Quelle für das kurzwellige Anregungslicht (Hg-Höchstdrucklampe, HBO 100W, Fa. Zeiss, Göttingen) und einer CCD-Kamera (Charged Coupled Device-Kamera, FK 90-IQ-S, Fa. Pieper, Düsseldorf). Die dritte Einheit ermöglicht die Visualisierung und Auswertung der Daten. Ein Monitor (Sony PVM-20M7MDE, Fa.Videocation, München) zeigt während des Mikroskopierens aktuelle Aufnahmen, die von einem Videogerät aufgenommen werden (Panasonic AG-7355, Fa.Videocation, München).

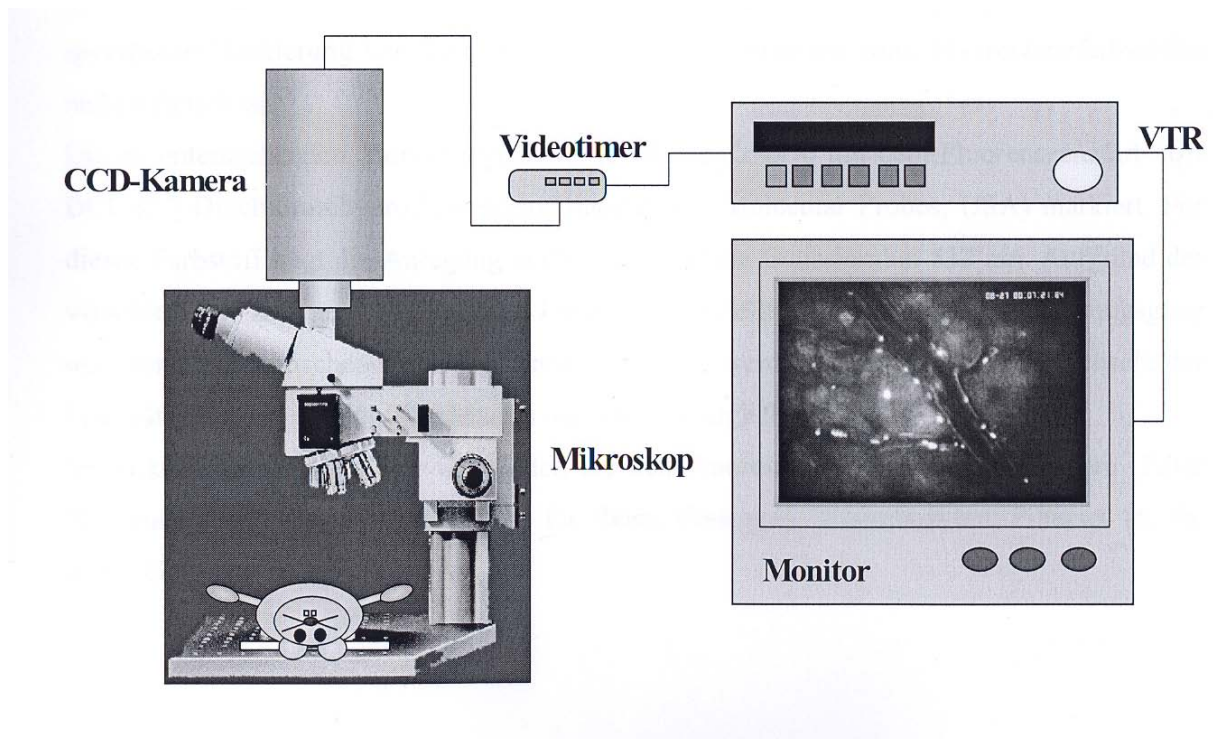


Abbildung 10: Skizze des Versuchsaufbau bei intravitale Videofluoreszenzmikroskopie

Sie zeigt das Epifluoreszenzmikroskop mit der CCD-Kamera und die Videoeinheit aus Videogerät und Monitor. Die Narkoseeinrichtung ist aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt⁵¹.

4.4.3 Übersicht über den Versuchsverlauf

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wird an jeweils 6 Tieren der Versuchs- und Kontrollgruppe durchgeführt. Da man beide Carotiden evaluiert, ergibt sich eine Anzahl von 12 untersuchten Carotiden. Zunächst gewinnt man aus einem geeigneten Spendertier Vollblut. Daraus werden Thrombozyten isoliert und mit DCF-Farbstoff markiert. Dann wird die Zahl der isolierten Blutplättchen gemessen und auf eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 120.000 Thrombozyten/ μl eingestellt. Schon während der Thrombozytenisolation beginnt man mit der Vorbereitung des Empfängertieres. Ein Katheter wird in die rechte Vena jugularis der narkotisierten Maus gelegt. Die Arteria carotis communis und die Bifurkation werden beiderseits freipräpariert. Über den venösen Zugang appliziert man dann 500 μl der Zellsuspension und beobachtet, einem genauen Protokoll folgend, unter dem Fluoreszenzmikroskop die Thrombozytendynamik.

4.4.4 Blutentnahme, Thrombozytenisolation und Markierung der Thrombozyten

Voraussetzung für die Markierung der Blutplättchen mit DCF-Farbstoff ist ihre Gewinnung und Isolation. Dazu benötigt man etwa 1,5 bis 2ml Vollblut eines Spendertieres, das denselben Genotyp wie das Empfängertier trägt und entsprechend gehalten und gefüttert worden ist. Die isolierten und markierten Thrombozyten einer Spendermaus reichen meist für die Durchführung des Versuches an zwei Empfängermäusen aus.

Für die Blutentnahme anästhesiert man die Spendermaus über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Isofluran Curamed, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) und Sauerstoff. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe (Stadium III₂) erreicht ist, gewinnt man durch intrakardiale Entnahme das Vollblut. Ein vorsichtiges Vorgehen verhindert die Aktivierung der Thrombozyten⁸⁶. 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Citrat (aus S-Monovetten, Sarstedt AG&Co., Nümbrecht) sorgen für die Ungerinnbarkeit des Blutes. Nach dem Auffüllen des Blutes mit Tyrodes-Puffer (pH=6,5) auf ein Gesamtvolumen von 2ml beginnt man mit der ersten Zentrifugation. Nach 20min bei 800rpm erhält man eine Auftrennung, die das Abheben des plättchenreichen Plasmas (PRP) ermöglicht. Das so gewonnene PRP wird wiederum mit Tyrodes-Puffer (pH 6,5) in der Weise gemischt, dass man ein Endvolumen von 4ml enthält. Nun wird dem Tyrodes-PRP-Gemisch 20 μl DCF-Farbstoff (2,7 Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat, Fa. Molecular Probes, USA) zugesetzt und 2min in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgt die

zweite Zentrifugation bei 2600rpm und einer Dauer von 10min, die zum Erhalt eines Thrombozytenpellets führt. Nach Abgießen des Überstandes wird das Pellet vorsichtig in einer Lösung aus gleichen Anteilen von Tyrodes-Puffer des pH-Wertes 6,5 (250µl) und 7,4 (250µl) resuspendiert.

Dieses Protokoll ist geeignet, Blutplättchen zu isolieren und zu färben, ohne eine ausgeprägte Voraktivierung dieser Blutzellen zu verursachen. Während der ganzen Behandlung der Thrombozyten ist darauf zu achten, die Schritte behutsam durchzuführen und die Substanzen bei einer Temperatur einzusetzen, die sich dem physiologischen Milieu der Thrombozyten annähert.

Nachdem die Blutplättchen in 500µl Tyrodes-Puffer-Gemisch aufgenommen worden sind, muss die Thrombozytenzahl in dieser Suspension bestimmt werden. Dies ermöglicht es, die Thrombozytensuspension auf eine Konzentration von 120000/µl unter Verwendung des Tyrodes-Puffers (pH=7,4) einzustellen.

Die Spendertiere werden durch die Blutentnahme getötet. Die Carotiden, sowie den Aortenbogen gewinnt man für die Quantifizierung des Ausmaßes an atherosklerotischer Läsion. Nach Sektion werden verschiedene Organe für histologische Verfahren entnommen.

4.4.5 Vorbereitung des Empfängertieres für die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie

Die Präparation des anästhesierten Tieres für die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie erfolgt unter einem Stereomikroskop. Eine Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Fa. Zeiss, Göttingen) garantiert eine optimale Ausleuchtung des Operationsfeldes. Die ventrale Halsregion des Tieres wird enthaart, gesäubert und mit Alkohol desinfiziert. Danach führt man einen medianen Hautschnitt vom Kinnwinkel (Ramus mandibulae) bis auf etwa die Höhe der ersten Rippe. Man versucht in diesem und in allen weiteren Schritten so minimal invasiv wie möglich vorzugehen, da die doppelt defizienten Tiere aufgrund der Thrombasthenie vermehrt bluten.

Nach der stumpfen Trennung der Speicheldrüsen werden diese vorsichtig seitlich aus dem Eingriffsfeld herausgelagert. Die rechte Jugularvene (Vena jugularis dextra) kann jetzt leicht indentifiziert und kurz vor dem Unterkieferknochen (Os mandibulare) mit einem Faden (Prolene[®], 7,0 metric, Fa.Ethicon, Norderstedt) ligiert werden. Im folgenden Schritt wird die Jugularvene herznah mit einem Gefäßclip (Miniclip, Medicon e.G., Tuttlingen) kurzzeitig

gestaut. Nun kann der Katheter (SIMS Portex, Hythe, England) durch eine kleine Inzision des Gefäßes in die Vena jugularis eingeführt und durch eine weitere Ligatur in Position gehalten werden. Der Gefäßclip wird daraufhin wieder entfernt und die korrekte Lage des Katheters durch eine Spülung mit isotoner Natriumchloridlösung (Isotone Kochsalzlösung, Delta Pharma GmbH, Pfullingen) geprüft. Anschließend präpariert man vorsichtig die Arteria carotis dextra und sinistra frei, ohne am Gefäß selbst zu manipulieren. Ein schwarzes, flexibles Stück Plastikfolie wird unter die freigelegten Arterien gelegt, um während der Aufnahme eine bessere Kontrastierung zu erreichen (siehe Abb.11). Die Maus wird nun unter das Mikroskop (Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop, Axiotech^{vario} 100HD, Fa Zeiss, Göttingen) gelegt.

Nachdem über den Katheter 500µl der DCF-markierten Thrombozyten-Zellsuspension appliziert worden sind, beginnt die Aufzeichnung des thrombozytären Verhaltens in der A. carotis.



Abbildung 11: Präparation des Empfängertieres

Das Photo zeigt eine auf den Rücken gelagerte Maus. Die ventrale Halsregion ist eröffnet; der rechte Anteil der Speicheldrüse entfernt, der linke nach außen verlagert. Beide Aa. carotides communes sind freipräpariert. Untergeschobene Filmfolien sorgen für einen besseren Kontrast während der Aufnahmen.

4.4.6 Durchführung der intravitralen Videofluoreszenzmikroskopie

Das Mikroskopieschema beginnt mit einer Übersichtsaufnahme in 250-facher Vergrößerung der rechten Arteria carotis communis, die auf Video 30sec lang aufgenommen wird. Es folgen

Aufnahmen mit einer Dauer von jeweils 30sec mit 500-facher Vergrößerung von 4 verschiedenen Bereichen der Arteria carotis communis. Dabei beginnt man mit dem ersten Fenster herznah und wandert in den vier Aufnahmen sukzessive nach kranial. Weiterhin mikroskopiert man entsprechend zwei verschiedene Ausschnitte aus der Region der Bifurkation.

In gleicher Weise verfährt man mit der linken Arteria carotis communis.

Die angegebenen Werte der Vergrößerung beziehen sich auf die Darstellung des Monitors und ergeben sich aus dem Faktor der Vergrößerung des Mikroskops und der Vergrößerung durch Kamera und Bildschirm.

4.4.7 Dokumentation

Zu jedem Versuch wird ein Datenblatt erstellt mit Informationen zu Versuchsdatum, Anästhesie, Tötungsmethode und eventuellen Komplikationen. Weiterhin sind Tiernummer, Geschlecht, Genotyp, Gruppenzugehörigkeit, Alter und Fütterungswoche des Empfängertieres vermerkt.

Zusätzlich dokumentiert man die gewonnene Blutmenge, die Thrombozytenzahl in der hergestellten Zellsuspension und die Zahl der applizierten Blutplättchen. Durch die Angabe des Zählerstandes der Video-Aufzeichnung können zu jeder Zeit die Videosequenzen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie einer bestimmten Maus zugeordnet werden.

4.4.8 Auswertung der Videoaufzeichnungen

Für die Auswertung der Aufzeichnungen werden die Bildsequenzen des Videobandes in einem Bild-zu-Bild-Verfahren analysiert. Evaluiert werden die Videosequenzen der zwei Regionen in der Bifurkation der A. carotis und zusätzlich zwei kranial und damit bifurkationsnah liegende Aufnahme Fenster aus dem Bereich der Arteria carotis communis.

In der Auswertung dieser Videosequenzen misst man zuerst auf dem Monitor mit einem angepassten Maßstab den reellen Durchmesser des Gefäßes. Man bedient sich dazu der übersichtlichen 250-fachen Vergrößerung. Anschließend wählt man auf den Bildern mit 500-facher Vergrößerung einen Bildausschnitt, der einer reellen Größe von $150\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ entspricht. Über eine Formel lassen sich die Werte des Gefäßdiameters mit dem

Bildausschnitt so vereinigen, dass sich ein Messfenster zur Evaluierung ergibt, das die Größe und Rundung des Gefäßes miteinbezieht:

Gefäßdurchmesser in μm x Kreiszahl π x $2x \sin^{-1}(\text{Breite des Messfensters in } \mu\text{m}/\text{Gefäßdurchmesser})$ x Länge des Messfensters in μm

Nun wertet man die Einzelbilder innerhalb des Bildausschnittes sukzessive aus, indem man adhärente Thrombozyten zählt. Man versteht Blutplättchen als adhärent, wenn sie 15sec oder länger auf dem gleichen Punkt am Endothel hängen. Thrombozyten, die an der Gefäßwand zum Halt kommen, aber kürzer als 15sec in dieser Position bleiben, werden in die Gruppe der transient adhären Zellen eingeordnet und nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Alle Werte werden in eine Tabellenvorlage (Microsoft Office 2000, Excel) eingetragen und unter statistischen Kautelen beurteilt.

4.5 Der Ausprägungsgrad der atherosklerotischen Veränderungen

Die folgenden Untersuchungen sollen klären, ob ein verändertes Verhalten der Thrombozyten am Gefäßendothel, das *in vivo* mithilfe der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann, Einfluss auf die Atheroprogession nimmt. Dabei erscheint es wichtig, die atherosklerotischen Veränderungen mit Hilfe verschiedener Methoden zu bestimmen, um detaillierte und umfassende Informationen über den Grad der Atherosklerose zu erhalten.

Zunächst soll gesichert werden, dass die cholesterinreiche Diät bei den Tieren zu vergleichbaren plasmatischen Cholesterinwerten führt, um ausschließen zu können, dass unterschiedliche Grade der Entgleisung des Cholesterinstoffwechsels die Plaqueformation beeinflussen.

Weiterhin erlaubt eine duplexsonographische Untersuchung der Bauchaorta (Aorta abdominalis) Aussagen über die Gefäßrigidität. Die Evaluierung lässt nicht nur eine Untersuchung eines großen Gefäßabschnittes zu, sondern gibt auch Hinweise darauf, ob das Gefäß in seiner Funktionalität durch die atherosklerotischen Veränderungen beeinträchtigt ist. Die Kombination aus zwei unterschiedlichen histomorphometrischen Analysen kann eine optimale Bestimmung der Plaquegröße gewährleisten. Eine *en-face* Evaluierung der Plaquegröße im Aortenbogen und der linken Carotide mittels Sudan-III-Färbung erlaubt eine

großflächige Analyse der Plaqueformation. Serielle Schnitte im Bereich der Bifurkation der rechten Carotide ergänzen durch punktuelle Information zur Plaquegröße das histologische Bild.

4.5.1 Bestimmung des plasmatischen Cholesterinspiegels

Das Versuchstier bleibt nach der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie in Narkose. Den Hautschnitt aus dem vorhergehenden Versuch erweitert man nach kaudal bis auf Höhe des Processus xiphoideus und präpariert die Haut stumpf vom Brustkorb ab. Durch den nun sichtbaren Herzspitzenstoß kann man die Herzlage genau beurteilen und kardial Blut entnehmen. Nach der Blutentnahme gewinnt man aus einem Teil des Vollblutes, das durch Citrat ungerinnbar gemacht wird, Plasma. 300µl des Plasmas werden der Messung des Gesamtcholesterinwertes zugeführt. Die Messung erfolgt mittels einer enzymatischen, kalorimetrischen Methode mit Cholesterinesterase, Cholesterinoxidase und 4-Aminoantipyrin^{2,152}. Ein Gerät ermöglicht eine automatisierte Messung, das Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers (COBAS INEGRA[®] 800, Roche Diagnostics, Basel, Schweiz).

4.5.2 Duplexsonographische Bestimmung der Gefäßwandrigidität

Während der Atheroprogression nimmt die Elastizität der Arterienwand durch Plaque-Bildung, Kalkeinlagerungen und Intimaproliferation kontinuierlich ab. In der Aorta kommt es dadurch einerseits zu einer Einschränkung der Windkesselfunktion, die hohe Blutflussraten während der Systole abschwächen kann, andererseits zu einer funktionellen Lumenverengung. Die Veränderung der systolischen Blutflussgeschwindigkeit im Verhältnis zur diastolischen macht man sich bei der duplexsonographischen Untersuchung zu Nutze.

Das Versuchstier erhält für diese kurze und nicht schmerzhafte Untersuchung eine Isofluran-Inhalationsnarkose, die der Maus über eine Nasenmaske zugeführt wird. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wird das Tier mit einer Matte auf der Liegefläche gewärmt.

Hat die Maus eine ausreichende Anästhesietiefe erreicht, wird das Fell im Bereich des Bauches mit Wasser angefeuchtet, glatt gestrichen und danach Ultraschallgel aufgetragen. Für

die Untersuchung arbeitet man mit einer hochauflösenden 8 Megahertz-Linearsonde (Acuson 15L8, Mountain View, USA). Folgende Einstellungen wählt man an dem Ultraschallgerät (Acuson Sequoia 512, Mountain View, USA): man arbeitet mit dem Programm Carotis General im D-Color Modus. Die Ablenkungsgeschwindigkeit des Dopplersignals stellt man auf 150mm/sec ein.

Ein Photo veranschaulicht den Versuchsaufbau (Abb. 12).



Abbildung 12: Durchführung der duplexsonographischen Untersuchung

Das Tier befindet sich auf einer Wärmematte in fixierter Rückenlage. Isofluran und Sauerstoff werden über eine Nasenmaske zugeführt.

An der Bauchorta misst man in einer dreifachen Bestimmung die Pulswellenkurve. Nach jeder Messung bestimmt man die Flussgeschwindigkeit (V) am Ende der Diastole (V_{dia}) und in der Systole (V_{sys}) an drei aufeinanderfolgenden Pulswellen einer Kurve. Das Gerät berechnet daraufhin den sogenannten „Resistance Index“ (RI), der ein Maß für die Rigidität der Arterienwand darstellt. Die Formel für den Resistance Index (RI) lautet:

$$RI = (V_{\text{sys}} - V_{\text{dia}}) / V_{\text{sys}}$$

In einer vorgelegten Tabelle vermerkt man neben Daten zur Identifikation des Versuchstieres die Werte der Flussraten während der Diastole und Systole und trägt den Resistance Index ein.

4.5.3 Sudan-III-Färbung

Mit dieser Methode, die häufig auch als Ölrot-Färbung bezeichnet wird, kann man Lipide in den Plaques rot anfärben. Die Plaquefläche hebt sich dadurch farblich deutlich von der restlichen Gefäßwand ab.

Dazu entnimmt man nach der Tötung des Versuchstieres den Aortenbogen und eine Arteria carotis. Ein Schema (Abb.13) zeigt die entnommenen Gefäßbereiche.

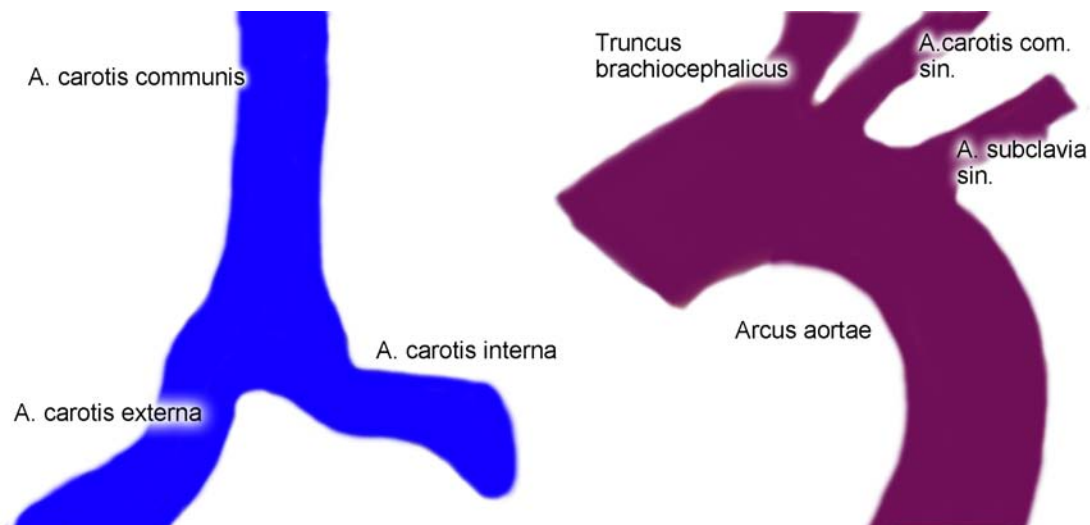


Abbildung 13: Schematische Darstellung der entnommenen Gefäßabschnitte

Nach der Entnahme durchspült man die Gefäße mit isotoner Kochsalzlösung und fixiert die Arterien in 4% Paraformaldehyd-PBS-Lösung (Paraformaldehyd, Fa.Sigma, Deisenhofen). Nach 24 Stunden Fixation befreit man die Gefäße vorsichtig von aufliegendem Fett- und Bindegewebe. Die anschließende Färbung beginnt mit der Überführung der Paraformaldehyd-getränkten Proben in Wasser (Aqua bidest.). Nach 1min gibt man die Arterien für 6min in 70% Ethanol und legt sie dann für weitere 25min in die Sudan-III-Färbelösung (Sudan III C.I. 26100, Merck, Darmstadt).

Nach der Färbung werden die Gefäße auf Petrischalen ausgelegt, durch Deckgläschen in Position gehalten und von isotoner Natriumchloridlösung umspült. Die so vorbereiteten Arterien fotografiert man nun am Mikroskop (Axiovert 100, Fa Zeiss, Göttingen) im Auflicht

bei 40-facher Vergrößerung (für Carotiden) und 25-facher Vergrößerung (für Aortenbögen) digital ab (AxioCam, Fa.Zeiss, Göttingen).

Anhand dieser Bilddateien können mit Hilfe eines Auswertesystems (Cap Image, Version 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg) die relativen und absoluten Plaqueflächen *en-face* quantifiziert werden (siehe Abb.14).

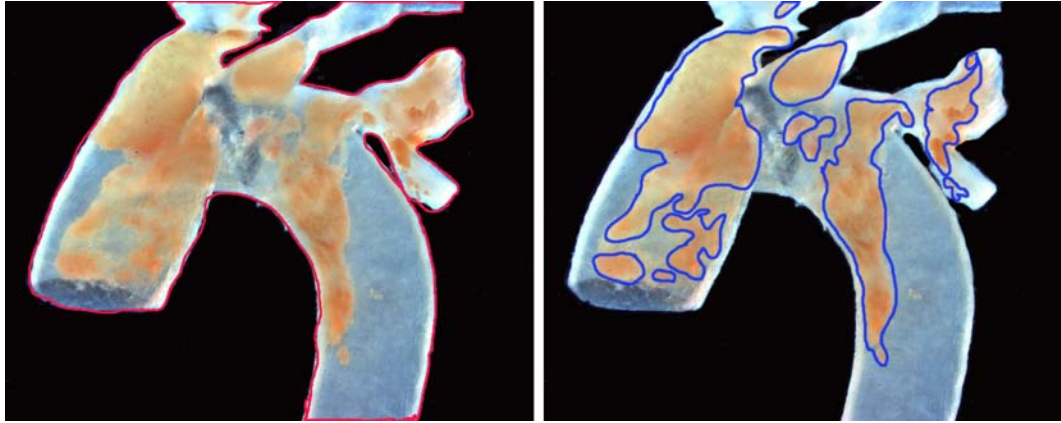


Abbildung 14: Darstellung der Ermittlung der relativen Plaquefläche

Im linken Bild wird die eindimensionale Gesamtfläche des Gefäßes gemessen, im rechten die absolute Plaquefläche innerhalb der Gesamtfläche; aus dem Verhältnis der beiden Flächen zueinander ergibt sich die relative Plaquefläche.

4.5.4 Van Giesson-Färbung

Gleichzeitig mit der Gefäßentnahme für die Sudan-III-Färbung entnimmt man auch von der rechten Halsschlagader obig dargestellten Gefäßausschnitt. Dieser wird 24 Stunden in 4,5% Formaldehyd-Lösung (Otto-Fischer GmbH, Saarbrücken) fixiert. Danach behandelt man das Präparat für die van Giesson-Färbung nach dem herkömmlichen Verfahren¹²⁸. Bei der Einbettung der Arterien achtet man darauf, dass das Präparat senkrecht im Paraffinblock fixiert wird, und die Aa. carotides internae und externae zur Anschnittsfläche des Blockes gerichtet sind.

Die seriellen Querschnitte von 2µm Dicke fertigt man an einem Rotationsmikrotom an. Zuerst tastet man sich bis zur Bifurkation heran. Der Beginn der Bifurkation ist in dieser Arbeit definiert als erster Querschnitt, in dem sich die Lumen der Aa. carotides internae und externae zu einem Lumen vereinigt haben. Von diesem Punkt an werden 25 Querschnitte angefertigt, in einem Wasserbad gestreckt (Paraffin Streckbad TB 35, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf) und gefärbt. Die Schnitte 1, 4, 8, 12, 16 und 20 werden digital abfotografiert (Mikroskop: Leica DMRB, Fa: Leica, Bensheim; Kamera: AxioCam, Fa.Zeiss, Göttingen)

und mit dem Cap-Image-Auswertesystem histomorphometrisch evaluiert. Dabei folgt man folgendem Schema (siehe Abb.15):

1. Messung der Gesamtfläche des Gefäßes (Fläche innerhalb der Membrana elastica externa),
2. Messung des Gesamtlumens (Fläche innerhalb der Membrana elastica interna),
3. Messung der Plaquerfläche,
4. Berechnung des Gefäßlumens (Differenz aus Gesamtlumen und Plaquerfläche).

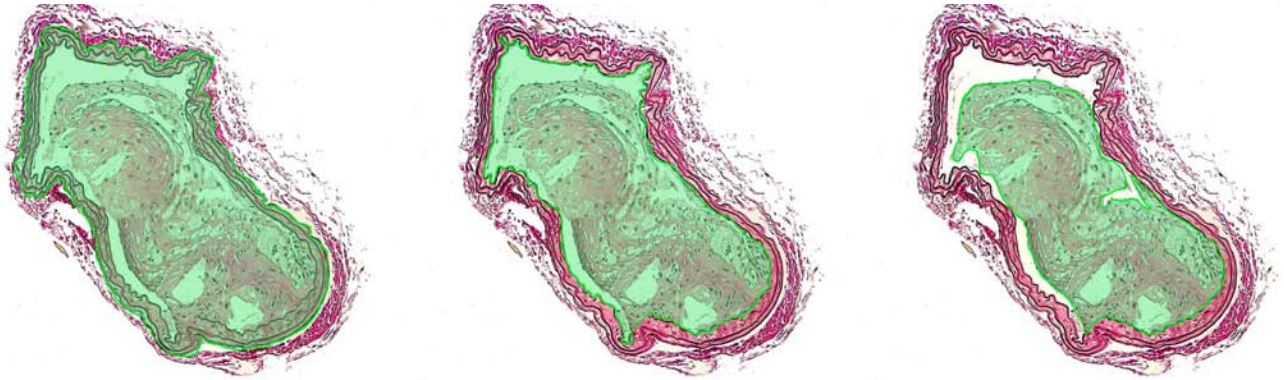


Abbildung 15: Darstellung der histomorphometrischen Auswertung serieller Schnitte

Die grün markierten Flächen werden gemessen. Im linken Bild wird die Gesamtfläche des Gefäßes, im mittleren Bild die Fläche innerhalb der Membrana elastica interna und im rechten Bild die Plaquerfläche ermittelt.

4.6 Statistische Berechnungen

Für die statistische Berechnung wird ein nicht parametrischer, unverbundener Test durchgeführt. Zunächst werden alle 4 Gruppen mit dem Kruskal-Wallis Test („Kruskal Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks“) verglichen und auf Signifikanz geprüft. Treten signifikante Unterschiede bei dem Vergleich der Gruppen auf, werden Gruppenpaare unabhängig voneinander mit dem Mann-Whitney Test („Mann-Whitney Rank Sum Test“) geprüft. Marcus et al.⁸³ beschreiben dieses statistische Verfahren erstmals. Für die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit wird ein Wert von $p < 0,05$ als signifikant eingestuft. Abweichend davon prüft man Werte der Rotationsthembelastographie nur mit dem Mann-Whitney Test, da hier insgesamt nur 2 Gruppen verglichen werden.

Für das obig genannte statistische Prozedere ist die Berechnung des Medianwertes einer Gruppe nötig, der mit dem Medianwert anderer Gruppen verglichen wird. Im Text sind jedoch Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Die statistische Berechnung erfolgt mit dem Programm Sigma Stat Version for Windows 2.0.

5 ERGEBNISSE

5.1 Die Zucht der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus

5.1.1 Das Zuchtergebnis

Im ersten Abschnitt der Arbeit entsteht ein neues Tiermodell, die GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus. Dabei muss die GPIIb^{-/-}-Knock-out-Maus (GPIIb^{-/-}C57Bl/6J) so mit der Zuchtlinie der ApoE^{-/-}-Maus (C57Bl/6J-Apo^{Etm1Unc}) gekreuzt werden, dass man eine doppelt defiziente Maus erhält. Dieses neue Tiermodell eignet sich für die Untersuchung der Bedeutung der GPIIb-IIIa-vermittelten Thrombozytenadhäsion für die Atherogenese.

Zunächst wird ein Grundstock von 6 Weibchen mit dem Genotyp GPIIb^{+/-}ApoE^{-/-} und zwei doppelt-defizienten Männchen aufgebaut.

In einem Zeitraum von 8 Monaten (1. Februar 2003 bis 29. Oktober 2003) gelingt es dann 96 doppelt-defiziente GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse zu züchten. 172 Tiere erweisen sich durch die Genotypisierung als heterozygot auf dem GPIIb-Lokus. Das Genotypenverhältnis von 96 GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen zu 172 heterozygoten GPIIb^{+/-}ApoE^{-/-}-Tieren entspricht aufgrund des gewählten Zuchtschemas (siehe Tab.6) nicht der zu erwartenden Verteilung des Genotyps (siehe Tab.13). Denn nur 36% der genotypisierten Tiere sind homozygot negativ auf dem GPIIb-Lokus, obwohl das Zuchtschema einen Wert von 50% doppelt defizienter Tiere in der Population voraussagt. Die Genotypisierung findet im Alter von 4 Wochen statt. Die geringere Anzahl an homozygoten Individuen entsteht aufgrund höherer Mortalitätsraten bei doppelt defizienten Individuen. Sowohl intrauterine Resorption, sowie das Verhalten der Mütter, schwache Jungtiere zu töten, sind mögliche Ursachen der beobachteten Genotypverteilung. Wie später genauer beschrieben, sind auch hämorrhagische Krisen Grund für die erhöhte Mortalität der doppelt-defizienten Mäuse (siehe Abschnitt 5.2.5 und 5.2.6).

Tabelle 13: Genotypverteilung

Genotyp	Anzahl der Tiere	Anteil des Genotyps [%]
GpIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	96	35,82
GpIIb ^{+/-} ApoE ^{-/-}	172	64,18
GpIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-}	0	0
Gesamt	268	100

34 der 96 doppelt defizienten Tiere werden für die Versuche innerhalb dieser Arbeit verwendet. 3 Männchen werden in der Zucht behalten. 16 der doppelt defizienten Tiere versterben im Alter zwischen 4 und 12 Wochen.

5.1.2 Genotypisierung der Mäuse unter Verwendung von PCR und Gelelektrophorese

Sowohl in der Zuchtlinie der ApoE^{-/-}-Mäuse, als auch der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse wird der ApoE-Lokus in regelmäßigen Abständen überprüft. Alle kontrollierten Individuen erweisen sich stets als defizient auf dem ApoE-Lokus. Die Abbildung 16 zeigt eine Genotypisierung einer ApoE^{-/-}-Maus mit einer heterozygoten Maus und einer Wildtypmaus als Kontrolltiere.

Bei allen Tieren aus der Linie der GPIIb/ApoE-Zucht wird der GPIIb-Lokus untersucht. In der obig genannten Zeitperiode der Zucht kontrolliert man also 268 Mäuse. 96 Tiere zeigen nach PCR und Gelelektrophorese eine Bandenaufteilung, die auf zwei Knock-out-Allele des GPIIb-Gens schließen lässt. Sie sind für den GPIIb-Lokus homozygot defizient. 172 Tiere kann man als heterozygot identifizieren. Mäuse, die zwei Wildtyp-Allele haben, treten zu diesem Zeitpunkt der Zucht nicht mehr auf, da mit homozygot defizienten Böcken gezüchtet wird (siehe Zuchtschema, Tab.6). Abbildung 16 zeigt ein Beispiel einer Genotypisierung.

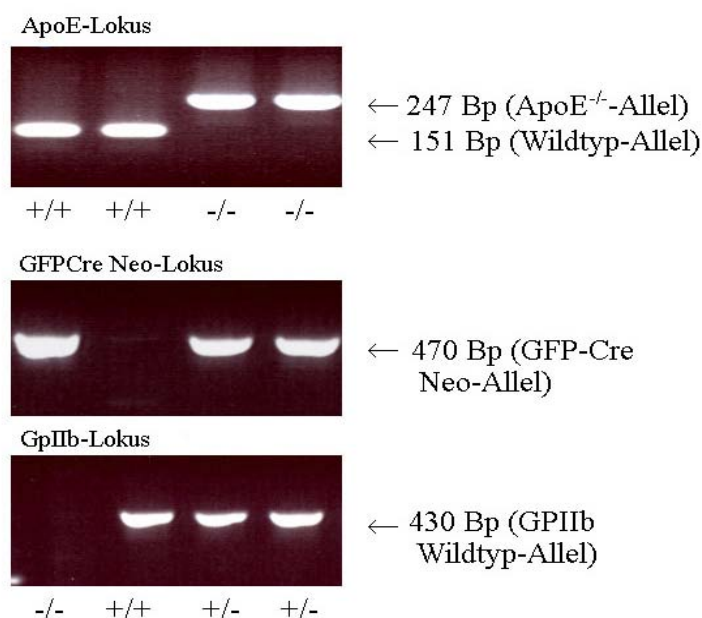


Abbildung 16: Gelelektrophorese

Die Abbildung zeigt die Bandenverteilung amplifizierter Gensequenzen des ApoE-Allels (oben), des GFPCre Neo-Allels (mitte) und des GPIIb-Allels (unten).

Eine Interpretation der Gelelektrophorese ist nur in Kombination der Bandenverteilung nach PCR der Cre-Rekombinase-Kassette und der PCR des GPIIb-Gens möglich (Einzelheiten siehe Abschnitt 4.2.3). Bei Tier 1, zum Beispiel, tritt keine Bande für den GPIIb-Lokus auf, die Bande der Cre-Rekombinase-Kassette beweist aber das Vorhandensein von Knock-out-Allelen. Dagegen zeigt bei Tier 2 die Bande für das GPIIb-Gen in Kombination mit dem Fehlen der Bande für die Cre-Rekombinase-Kassette die Intaktheit der GPIIb-Allele an. Es handelt sich somit um ein Wildtyp-Tier.

Ein möglicher Grund für das Fehlen einer Bande ist aber nicht nur das Fehlen des zu analysierenden Gen-Abschnittes, denn auch Fehler während der PCR können zu einem Ausbleiben der Bande führen. Um diese Unsicherheit auszuschalten, wird jedes Ergebnis der Genotypisierung durch den Nachweis der Expression des Glykoproteins GPIIb-IIIa mit Immunophänotypisierung überprüft.

5.1.3 Prüfung des Phänotyps mittels Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie kann die Expression des GPIIb-IIIa-Integrinrezeptors auf der Oberfläche der Thrombozyten evaluiert werden und so die Ergebnisse aus der PCR und Gelelektrophorese nochmals gegengeprüft werden.

Bei 177 Tieren aus der GPIIb/ApoE-Zucht wird die durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Nach einer Färbung der Thrombozyten mit zwei fluorochrommarkierten Antikörpern (anti-CD41-FITC und anti-CD61-PE) kann man in 63 der Proben eine deutlich verminderte Fluoreszenz der markierten Thrombozyten messen (siehe Abb. 17). Sie stammen von doppelt defizienten Mäusen. Ein Fehlen der Fluoreszenz ist auch bei vollständig unterdrückter Expression eines Rezeptors nicht zu erwarten, da unspezifische Bindungen des Antikörpers an der Thrombozytenoberfläche auftreten. Folgende Abbildungen zeigen die unterschiedliche Intensität der CD61-PE und CD41-FITC Fluoreszenz aufgrund mangelnder Bindungsmöglichkeit auf der Zelloberfläche bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen. 91 Tiere werden nicht immunophänotypisiert und deshalb auch nicht in der Gruppeneinteilung berücksichtigt.

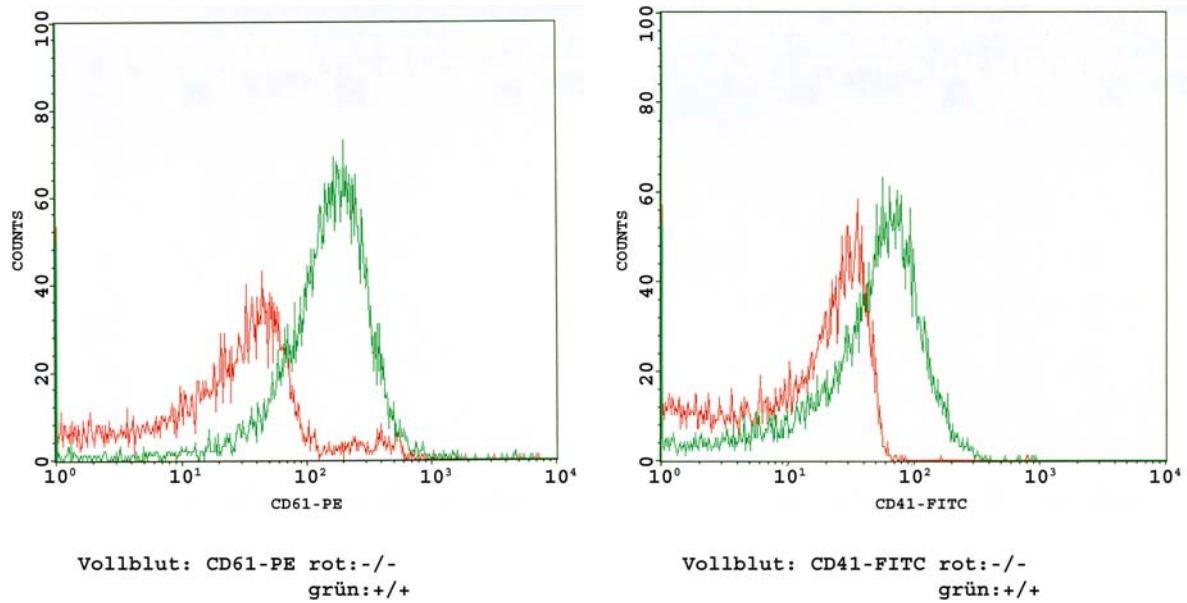


Abbildung 17: Immunphänotypisierung im Vollblut

Die Abbildung zeigt die verminderte Fluoreszenz der mit anti-CD61-PE und anti-CD41-FITC gefärbten Thrombozyten im Vollblut einer GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus [rot] im Vergleich zu einer ApoE^{-/-}-Maus (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Maus) [grün].

Bei 177 der analysierten Mäuse weisen 63 den Phänotyp einer Knock-out-Maus auf (siehe Tab. 14). Dies entspricht 36% der untersuchten Tiere und spiegelt das Ergebnis der Genotypisierung wieder. Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie und Genotypisierung fallen bei drei Tieren nicht übereinstimmende Resultate auf. Diese Mäuse werden nicht für die Versuche herangezogen. Bei 174 Mäusen stimmen die Ergebnisse aus der Genotypisierung und der Phänotypisierung überein.

Tabelle 14: Phänotypverteilung

Phänotyp	Anzahl der Tiere	Anteil des Phänotyps [%]
`GPIIb-´	63	36
`GPIIb+´	114	64
Gesamt	177	100

5.2 Die Charakterisierung der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus

5.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der Expression Adhäsions-vermittelnder thrombozytärer Membranproteine

Prinzipiell gilt es auszuschließen, dass der Mangel an GPIIb-IIIa die Expression anderer thrombozytärer Oberflächenrezeptoren beeinflusst.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen selektiv die Expression von GPIIb-IIIa stark reduziert ist, die thrombozytären Adhäsionsrezeptoren GPVI, GPIb-V-IX und P-Selektin in ihrer Expression jedoch unbeeinflusst bleiben. Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Kurvendiagramme der Rezeptorexpression.

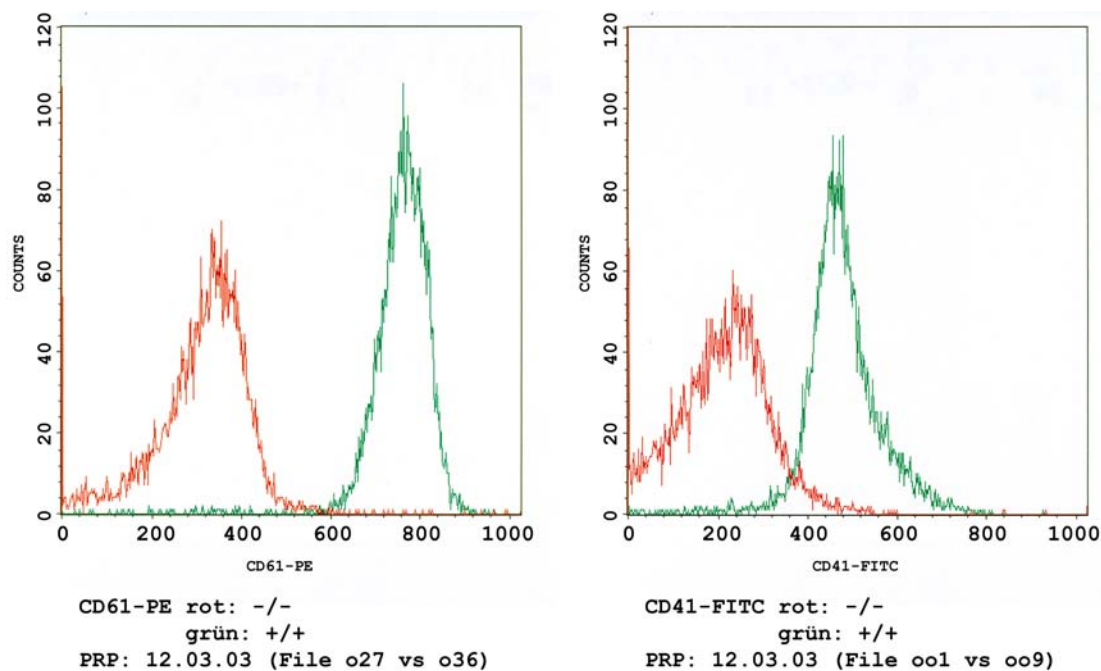


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der Expression des GPIIb-IIIa im PRP

Die Kurvendiagramme zeigen die stark verminderte Fluoreszenz der mit anti-CD61-PE und anti-CD41-FITC gefärbten isolierten Thrombozyten einer GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus [rot] im Vergleich zu einer ApoE^{-/-}-Maus (=GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}-Maus) [grün].

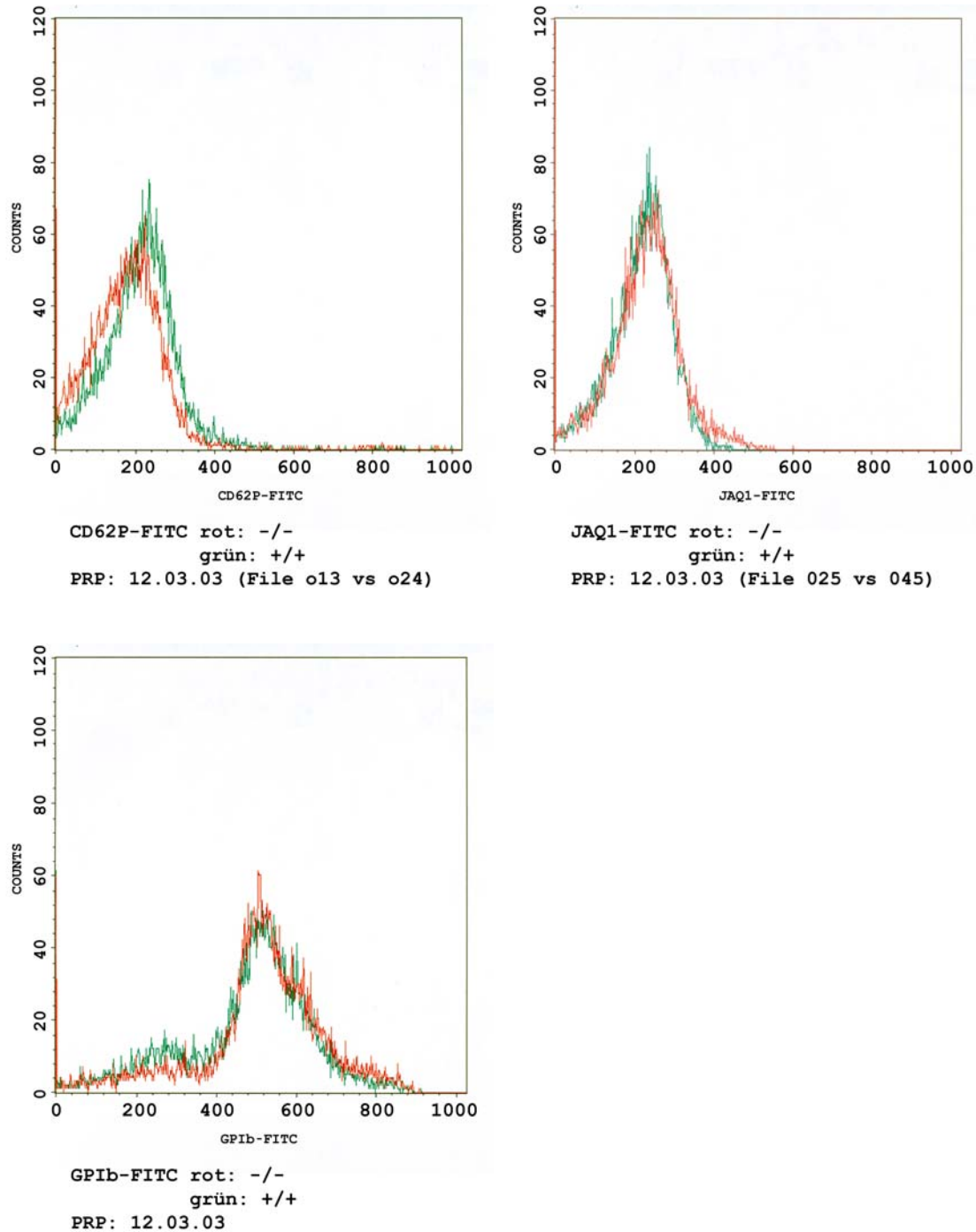


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Expression des P-Selektins, GPVI und GPIb-V-IX im PRP

Die Kurvendiagramme zeigen eine unveränderte Expression von P-Selektin [links oben], GPVI [rechts oben] und GPIb-V-IX [links unten] auf isolierten Thrombozyten einer GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus [rot] im Vergleich zu einer ApoE^{-/-}-Maus (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Maus) [grün].

Tabelle 15: Expression [Medianwerte] unterschiedlicher thrombozytärer Membranproteine in durchflusszytometrischer Analyse

	CD41 (FITC)	CD61 (PE)	CD62P (FITC)	GPVI (FITC)	GPIb (FITC)	Isotyp (PE)	Isotyp (FITC)	ungef
GPIIb^{-/-}-ApoE^{-/-}								
Tier 1	214,00	312,00	184,00	268,00	522,00	220,00	127,00	61,00
Tier 1	225,00	309,00	174,00		521,00	208,00	140,00	61,00
Tier 2	211,00	319,00	177,00	232,00	533,00	209,00	126,00	60,00
Tier 2	182,00	329,00	175,00		531,00	197,00	108,00	60,00
MW	208,00	317,25	177,50	250,00	526,75	208,50	125,25	60,50
Stabw	15,89	7,69	3,91	18,00	5,31	8,14	11,39	0,50
ApoE^{-/-}								
Tier 1	469,00	764,00	216,00	225,00	506,00	187,00	29,00	60,00
Tier 1	463,00	764,00	222,00	220,00	498,00	196,50	100,00	60,00
Tier 2	442,00	762,00	185,00	182,00	466,00	55,00	110,00	60,00
Tier 2	416,00	762,00	181,00	185,00	477,00	79,00	127,00	61,00
MW	447,50	763,00	201,00	203,00	486,75	129,38	91,50	60,25
Stabw	20,77	1,00	18,18	19,61	15,99	63,04	37,35	0,43

5.2.2 Die Blutungszeit

Die Messung der Zeit von der Induktion einer Blutung am Schwanzspitzengewebe bis zu ihrem Versiegen gibt Information über mögliche Hämostasestörungen. Im Gegensatz zur Thrombelastographie, in der die Gerinnselbildung außerhalb des Körpers beobachtet wird, kann die Blutungszeit Veränderungen der Hämostase im physiologischen Milieu aufdecken. Bei allen 15 getesteten GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen übersteigt, unabhängig von Alter und Geschlecht, die Dauer der Blutung 20min (nach Überschreiten dieser Dauer wurde die Wunde koaguliert, um einen weiteren Blutverlust zu verhindern). Bei insgesamt 16 getesteten ApoE^{-/-}-Mäusen beträgt die Zeit der Blutung im Mittel 11,6 ± 5,5min (p<0,05 vs. GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse).

Tabelle 16: Blutungszeiten [min] von GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen

Gruppe	12 Wochen alt		16 Wochen alt	
	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Tier 1	20	10	20	6
Tier 2	20	10	20	4
Tier 3	20	8	20	6,5
Tier 4	20	10	20	19,3
Tier 5	20	11	20	20
Tier 6	20	12	20	8
Tier 7	20	14	20	20
Tier 8	20	7		20
Anzahl	n=8	n=8	n=7	n=11
Mittelwert	20,00	10,25	20,00	12,98
±Stabw	0,00	2,19	0,00	7,41

5.2.3 Funktionelle Evaluierung der Hämostase

Auch die Rotationsthrombelastographie ermöglicht es zu prüfen, ob und inwiefern bei den GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen eine gestörte Hämostase vorliegt. Die Methode gibt Aufschluss über Gerinnungszeit, Dynamik der Gerinnselfestigkeit, maximale Gerinnselfestigkeit und Gerinnselfestigkeit bzw. -fibrinolyse und erlaubt damit eine funktionelle Evaluierung der komplexen Thrombozytenfunktion während der Hämostase.

Die Kurven, die die viskoelastischen Eigenschaften des Blutkoagels aufzeichnen, zeigen bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen keine signifikant veränderten Werte der Gerinnungszeit (CT = Clotting Time) im Vergleich zur ApoE^{-/-}-Gruppe (Mittelwert VG: 125sec ± 31; Mittelwert KG: 114sec ± 20). Dagegen ist die Gerinnselfestigungszeit (CFT= Clot Formation Time) bei den Doppel-Knock-outs signifikant verlängert (Mittelwert VG: 123sec ± 52; Mittelwert KG: 34sec ± 20). Weiter erkennt man eine signifikante Reduktion der maximalen Gerinnselfestigkeit (=MCF) bei den doppelt defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert VG: 36mm ± 4; Mittelwert KG: 73mm ± 7).

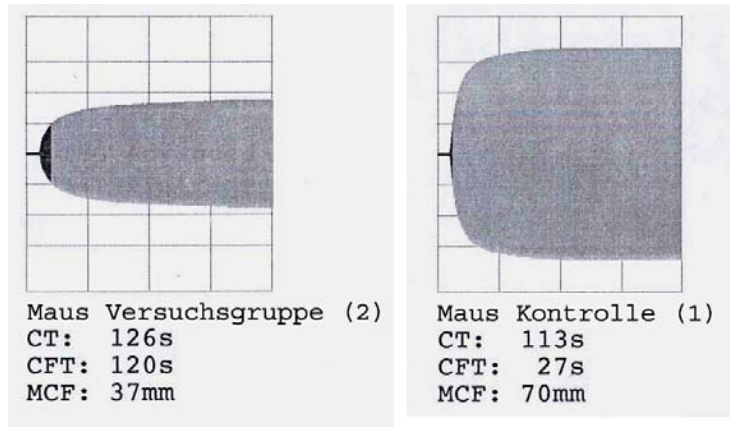


Abbildung 20: Thrombelastogramm

Die Abbildung zeigt beispielhaft das Thrombelastogramm einer GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus (links) und einer ApoE^{-/-}-Maus (rechts).

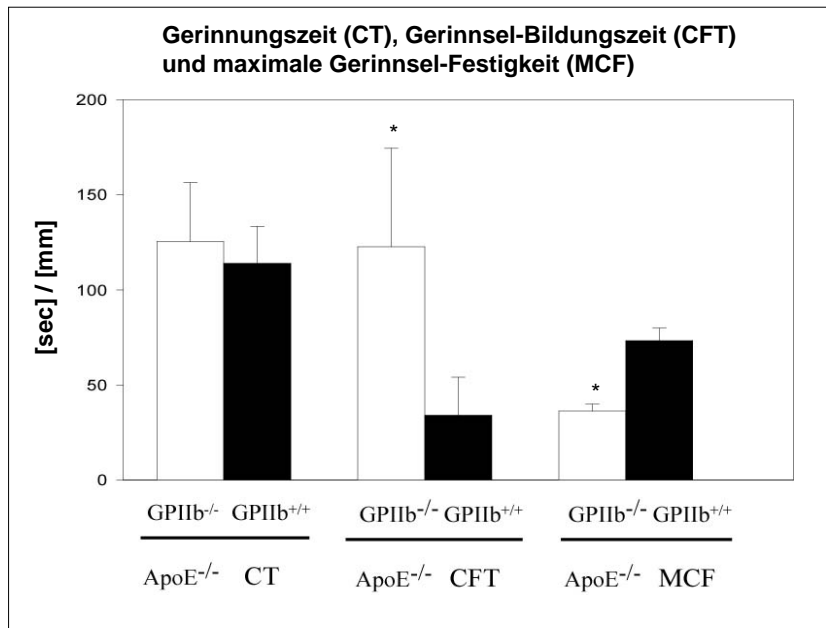


Abbildung 21: Thrombelastographie

Darstellung der Gerinnungszeit [sec], Gerinnsel-Bildungszeit [sec] und maximaler Gerinnsel-festigkeit [mm] bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen).

* p<0,05 vs. GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}

Tabelle 17: Einzelwerte der Gerinnungszeit (CT) [sec], Gerinnsel-Bildungszeit (CFT) [sec] und maximaler Gerinnselfestigkeit (MCF) [mm] bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen

Parameter	CT		CFT		MCF	
	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Tier 1	108	115	130	30	33	71
Tier 2	137	132	236	21	35	67
Tier 3	142	74	108	83	38	83
Tier 4	124	113	135	27	32	70
Tier 5	91	121	110	31	36	68
Tier 6	90	98	65	23	44	73
Tier 7	126	129	120	28	37	70
Tier 8	185	129	77	29	35	84
Anzahl	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
Mittelwert	125,4	113,9	122,6	34,0	36,3	73,3
±Stabw	30,9	19,6	51,9	20,1	3,7	6,6

5.2.4 Einfluss der Gendefekte auf die Blutzusammensetzung

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Blutmenge pro Maus beschränkt man sich bei der Analyse der Blutzusammensetzung auf die Bestimmung des Hämatokrits, des Hämoglobingehaltes und der Thrombozytenzahl. Alle Werte sollen Hinweise auf mögliche klinische Veränderungen, wie zum Beispiel Anämie oder Thrombozytopenie geben, deren Auftreten aufgrund der Funktionsstörung der Thrombozyten denkbar ist.

Hämatokrit:

Die Hämatokritwerte schwanken in ihrem Mittel nur schwach und nicht signifikant in den vier untersuchten Gruppen. Trotzdem bleibt anzumerken, dass die doppelt defizienten Mäuse in beiden Altersgruppen tendenziell niedrigere Hämatokritwerte ($41,2\% \pm 3,8$ und $39,5\% \pm 4,2$) aufweisen, als ihre jeweiligen Kontrollgruppen ($43,1\% \pm 3,1$ und $43,4\% \pm 2,3$). Die Mittelwerte der doppelt defizienten Mäuse liegen knapp unterhalb eines Wertespektrums, das von verschiedenen Autoren für gesunde C57Bl/6 Mäuse im Alter zwischen 1-6 Monate erarbeitet wurde. [Frith et al.³⁷ und Schnell et al.¹³⁴ finden Mittelwerte von 42,7% bis 50,5%].

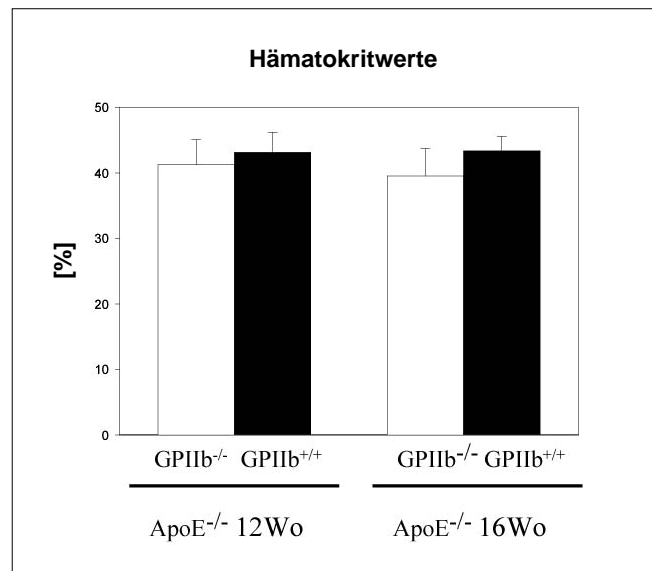


Abbildung 22: Hämatokrit

Das Diagramm zeigt Hämatokritwerte von GpIib^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (=GpIib^{+/+} ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.

Hämoglobingehalt:

Betrachtet man die Hämoglobinwerte, so ist festzustellen, dass bei den 12 Wochen alten GpIib^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen die Werte (MW+Stabw: 11,9 ± 1,1g/dl) signifikant niedriger ausfallen, als die Werte der ApoE^{-/-}-Mäuse derselben Altersgruppe (MW+Stabw: 13,3 ± 0,4g/dl). Ähnlich verhält es sich in der Gruppe der 16 Wochen alten Tiere. Auch hier ist der Hämoglobingehalt bei den doppelt defizienten Tieren (MW+Stabw: 11,7 ± 1,1g/dl) signifikant geringer als der Gehalt bei den Kontrolltieren (MW+Stabw: 14,0 ± 0,7g/dl).

[Schnell et al.¹³⁴ geben Mittelwerte zwischen 14,7g/dl und 15g/dl für gesunde Mäuse an, die von allen hier untersuchten Gruppen unterschritten werden].

Aufgrund der geringen Hämoglobinwerte der GpIib^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäuse in Kombination mit einem leichten Hämatokritabfall lässt sich sagen, dass Mäuse mit diesem Genotyp dazu neigen eine Anämie zu entwickeln.

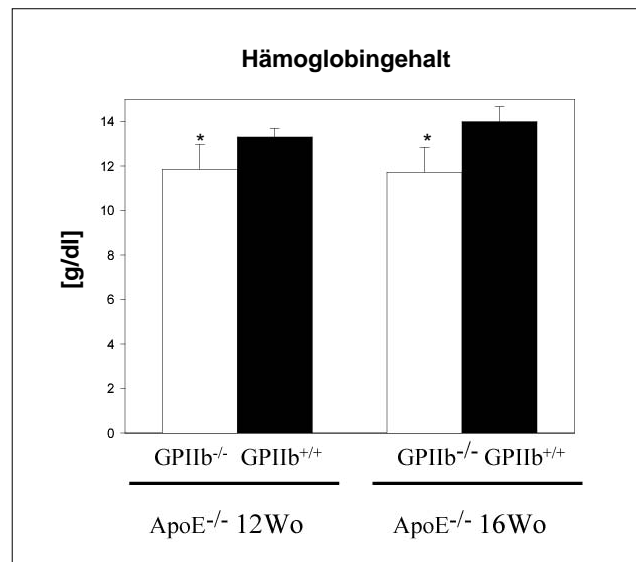


Abbildung 23: Hämoglobingehalt

Das Diagramm zeigt den Hämoglobingehalt des Blutes bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.

* p<0,05 vs. GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}

Thrombozytenzahl:

Bei der Bestimmung der Thrombozytenzahlen kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Mittelwerte bewegen sich in einem Bereich zwischen 623,6x10³/µl und 794,4x10³/µl Vollblut. [Genaue Referenzwerte sind bei Mäusen mit dem genetischen Hintergrund des C57Bl6/J-Stammes nicht veröffentlicht. Die hier gefundenen Zahlen stimmen aber mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, die mit transgenen Mäusen des C57Bl6/J-Stammes oder dessen Wildtypmäusen arbeiten^{134,153}].

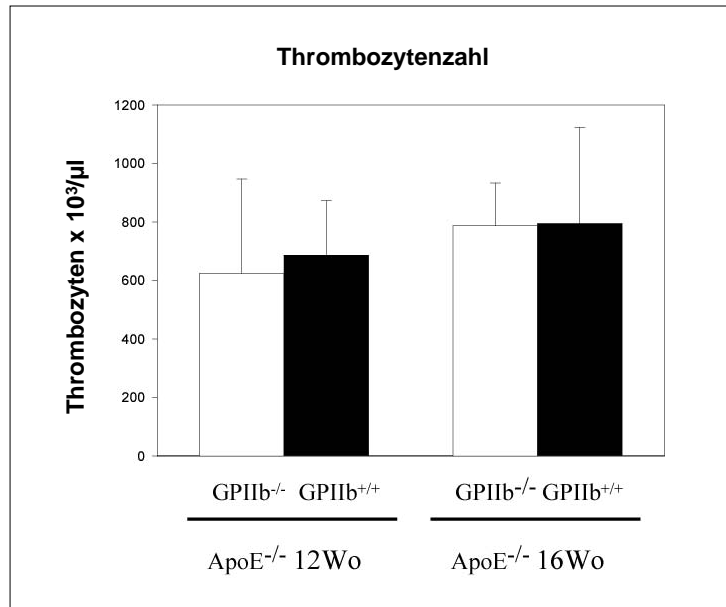


Abbildung 24: Thrombozytenzahl

Das Diagramm stellt die Thrombozytenzahl bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen dar.

Tabelle 18: Einzelwerte des Hämoglobingehaltes [g/dl], Hämatokritwertes [%] und der Thrombozytenzahl [$\times 10^3/\mu\text{l}$]

Gruppe	12 Wochen alt		16 Wochen alt	
	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Anzahl	n=7	n=7	n=7	n=7
Hämoglobinwerte				
Tier 1	11,7	12,7	12,5	14,9
Tier 2	12,5	13,4	12,8	13,5
Tier 3	12,6	13,4	10,6	13,6
Tier 4	13,4	12,9	13,3	13,7
Tier 5	10,2	13,7	11,2	14,9
Tier 6	11,9	13,8	10,9	14,1
Tier 7	10,7	13,2	10,7	13,2
Mittelwert	11,9	13,3	11,7	14,0
±Stabw	1,1	0,4	1,1	0,7
Hämatokritwerte				
Tier 1	36	36,9	42,7	45,4
Tier 2	46	42,8	41,7	43,3
Tier 3	41,7	45	36,6	43,9
Tier 4	45	42	46,1	40,8
Tier 5	37	46,2	39,3	41
Tier 6	40	43,9	34,9	46,9
Tier 7	43	45,1	35,4	42,2
Mittelwert	41,2	43,1	39,5	43,4
±Stabw	3,8	3,1	4,2	2,3
Thrombozytenzahl				
Tier 1	98	336	904	882
Tier 2	739	672	920	904
Tier 3	442	595	842	767
Tier 4	1005	703	704	1141
Tier 5	984	909	794	970
Tier 6	645	840	496	793
Tier 7	452	749	846	104
Mittelwert	623,6	686,3	786,6	794,4
±Stabw	323,5	186,5	146,9	328,6

5.2.5 Charakterisierung der organischen Veränderungen – makroskopische Befunde

Bei insgesamt 18 GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen wird eine Sektion vorgenommen. Diese dient der Erfassung möglicher makroskopischer Veränderungen, die bei dem neuen Tiermodell auftreten. 10 ApoE^{-/-}-Tiere dienen in der Sektion als Vergleich.

Betrachtet man Veränderungen, die aufgrund des gestörten Cholesterinstoffwechsels auftreten, so werden bei beiden Genotypgruppen wiederkehrende Befunde erhoben. Man findet bei den GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen Hautabnormalitäten, die als Alopezie (10/18), Pachydermie (17/18) und Exkorationen (2/18) ausgeprägt sind. Die kranken Hautpartien befinden sich im Bereich des Nackens, Oberarme und Unterbauch, sind zum Teil aber auch an anderen Bereichen der Körperoberfläche zu beobachten. Entsprechend sieht man auch bei den ApoE^{-/-}-Mäusen Alopezie (8/10), Pachydermie (10/10) und Exkorationen (1/10). Diffus verteilte Cholesteatome in der Nierenkapsel und der Darmwand fallen bei doppelt defizienten (Nierenkapsel: 15/18; Darmwand: 11/18), gleichwie bei einfach defizienten Tieren (Nierenkapsel: 6/8; Darmwand: 6/7) auf. Eine Fettleber besteht ausnahmslos bei allen seziierten Mäusen.

Folgende Befunde, die nicht im Zusammenhang mit dem veränderten Cholesterinstoffwechsel stehen, können erhoben werden:

Splenomegalie wird bei 13/17 der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse befundet und tritt damit bei dieser Gruppe sehr viel häufiger als bei der Kontrollgruppe auf (3/9).

Unterschiedliche Veränderungen der Lunge und der Pleura werden in der Gruppe der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse wiederholt diagnostiziert. Bei fünf Tieren lassen sich gerötete, derbe Lungenlappen erkennen, bei einem Tier schwartige Verwachsungen der Pleura und bei einem weiteren ein Pleuraerguss. Dagegen erscheint die Lunge und die Brusthöhle bei ApoE^{-/-}-Mäusen makroskopisch unbeeinträchtigt.

Ausschließlich bei Mäusen mit defektem GPIIb-IIIa-Integrinrezeptor fallen in der Sektion zusätzlich innere Blutungen auf, welche sich in Form von Ekchymosen, petechialen Blutungen (11/17) und Hämorrhagien (9/17) präsentieren.

Photos der Veränderungen sind beispielhaft in Abbildung 25 dargestellt.

Tabelle 19: Pathologische Befunde bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen)

Tiernr.	Sex	Alter [Wo]	Fütterung [Wo]	Gewicht [g]	Alopezie	Pachydermie	Exkorationen	Plaques in AB	Cholesteatome	Fettleber	Splenomegalie	petechiale Blutungen	Hämorrhagien
GpIIb^{-/-}ApoE^{-/-}													
1	m	16	12	31	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	m	16	12	31	x	x		x	x	x	x	x	x
3	m	16	12	n.a.	x	x		x	x	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	m	16	12	30	x	x		x	x	x	x		x
5	w	16	12	27	x	x		x		x			
6	m	16	12	28		x		x	x	x	x		x
7	w	16	12	17		x		x	x	x	x		x
8	m	12	8	17					x	x	x	x	
9	w	12	8	27		x		x	x	x	x	x	
10	w	12	8	n.a.	x	x			x	x	x		
11	m	12	8	n.a.	x	x		x	x	x	x	x	x
12	m	12	8	n.a.		x		x	x	x	x	x	
13	m	12	8	28		x		x	x	x	x	x	
14	m	12	8	n.a.		x		x	x	x	x	x	x
15	m	12	8	29	x	x		x	x	x			
16	m	12	8	29	x	x		x	x	x		x	x
17	m	12	8	n.a.	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	m	12	8	n.a.		x		x	x	x		x	
ApoE^{-/-}													
1	m	16	12	30	x	x		x	n.a.	x			
2	m	12	8	25		x		x	x	x			
3	m	12	8	23		x		x	x	x			
4	w	16	12	26	x	x		x	x	x	x		
5	w	16	12	21	x	x	x	x	x	x	x		
6	m	12	8	29	x	x		x	x	x			
7	m	12	8	31	x	x		x	x	x			
8	m	16	12	30	x	x		x	x	x			
9	w	12	8	22	x	x		x	n.a.	x	x		
10	w	12	8	20	x	x		x	n.a.	x	n.a.		

Abkürzungen: AB: Aortenbogen
n.a.: nicht ausgewertet
m: männlich
w: weiblich

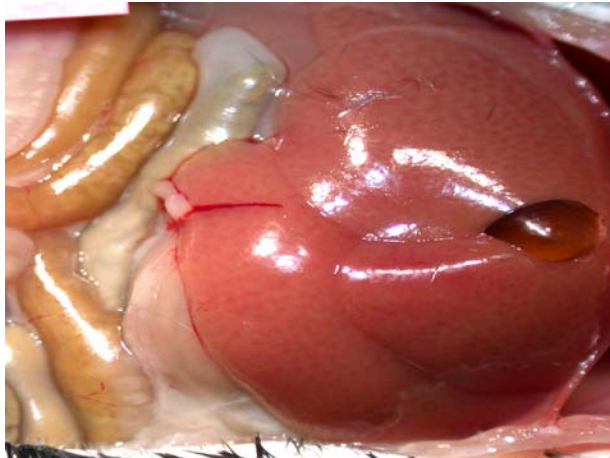
Pathologische Veränderungen bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen



Alopezie und Exkorationen in der Backenregion



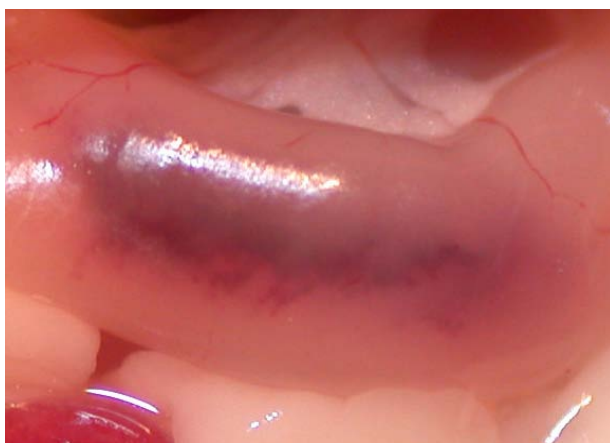
Alopezie und Pachydermie der ventralen Halsregion



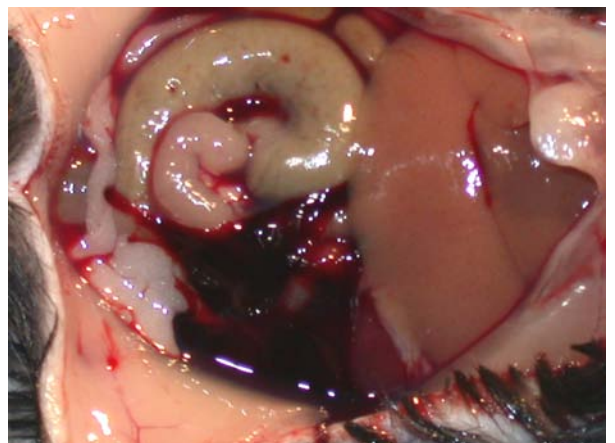
Hepatolipidose (Die Leber ist deutlich vergrößert; die Leberläppchen sind sichtbar)



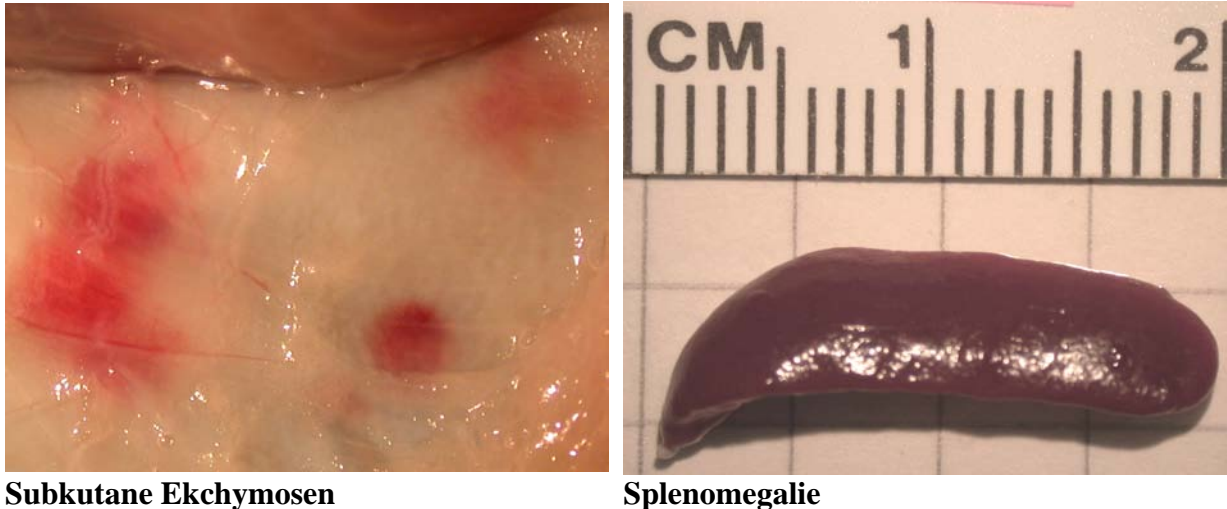
Cholesteatom in der Darmwand



Flächige Blutung in der Darmwand



Blutiger Aszites



Subkutane Ekchymosen

Splenomegalie

Abbildung 25: makroskopische Veränderungen

Die Photographien zeigen Beispiele der in der Sektion gefundenen pathologischen Veränderungen von $\text{GPIIb}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäusen.

5.2.6 Charakterisierung der organischen Veränderungen – histopathologische Befunde

Organe von 11 $\text{GPIIb}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäusen und 8 $\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäusen werden der histopathologischen Diagnostik zugeführt. Schnitte der Lunge, Leber, Milz, Niere, des Knochenmarks des Femurschaftes und des Darmes werden mit verschiedenen Färbungen behandelt und untersucht.

Alle Tiere beider Genotypgruppen weisen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung eine Hepatolipidose ähnlicher Ausprägung auf. Dies entspricht dem obig genannten makroskopischen Bild. Bei einer doppelt defizienten Maus können durch die Berliner-Blau-Reaktion zusätzlich Hämosiderin-Ablagerungen im hepatischen Gewebe nachgewiesen werden.

Bei der Auswertung der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte der Lunge zeigt sich, dass 7 von 10 aller $\text{GPIIb}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäuse leukozytäre Infiltrationen aufweisen. Bei einem Tier tritt eine fokal begrenzte, granulomatöse Pneumonie auf. Bei den $\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäusen erkennt man dezente leukozytäre Infiltrationen in 3 Fällen. Weiterhin fällt bei den Schnitten der $\text{GPIIb}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$ -Tiere ein Lungenödem (6/10) auf, welches bei keinem der Schnitte der Kontrollgruppe präsent ist. Außerdem diagnostiziert man bei 8 von 10 der $\text{GPIIb}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$ -

Mäuse eine Verdickung der Gefäßwand der pulmonalen Arterien. Nach einer Abklärung der Art der Verdickung mit Hilfe einer Elastica-van-Giesson-Färbung und einer Kongorot-Färbung, kann gezeigt werden, dass eine Hypertrophie der Gefäßwand vorliegt. Diese Hypertrophie kann nur bei einer der Mäuse der Kontrollgruppe beobachtet werden (1/8).

Frische Hämorrhagien in der Lunge werden bei 5 von 10 der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse gesehen, die in der Kontrollgruppe bei keinem Tier vorkommen. Mithilfe der Berliner-Blau-Reaktion gelingt es über den Hämosiderinnachweis bei einer doppelt defizienten Maus (1/10) chronische Blutungen der Lunge zu detektieren. Alle anderen Tiere erweisen sich im Hämosiderinnachweis in der Lunge als negativ.

Schnitte der Niere, die mit Hämatoxylin-Eosin und Perjodsäure-Schiff-Reaktion gefärbt werden, zeigen keine pathologischen Veränderungen, so dass die pulmonale Hypertrophie nicht auf einen renalen Ursprung zurückzuführen ist.

Eine Evaluierung der Milz zeigt, dass bei der Gruppe der doppelt defizienten Mäuse eine gesteigerte extramedulläre Blutbildung auftritt, welche an einem gehäuften Auftreten von Megakaryozyten zu erkennen ist. Bei 8 von 11 GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Tieren findet man eine mittelgradig gesteigerte, bei einem weiteren eine geringgradig ausgeprägte extramedulläre Blutbildung in der Milz. Bei allen Mäusen der Kontrollgruppe findet man ebenfalls eine geringgradig vorhandene extramedulläre Blutbildung, die aufgrund des geringen Alters der Tiere als physiologisch anzusehen ist.

Parallel dazu findet man auch im Knochenmark des Femurschaftes bei allen ausgewerteten doppelt defizienten Mäusen (8/8) eine gesteigerte medulläre Blutbildung. Hinweis auf die vermehrte Bildung von Blutzellen ist wiederum das stark gehäufte Auftreten von Megakaryozyten. Ein gesteigertes Vorkommen dieser Zellen ist bei der Kontrollgruppe nur bei einem Tier (1/8) nachzuweisen.

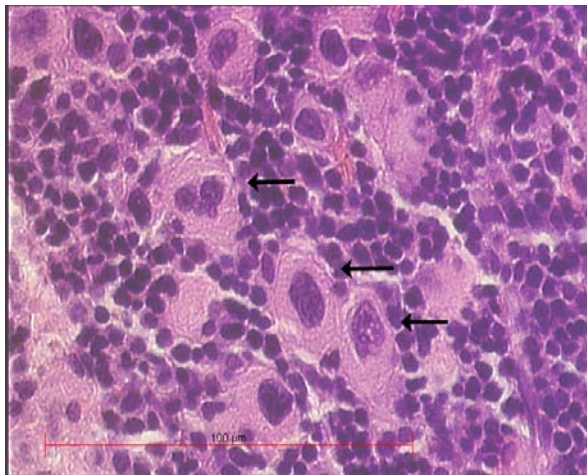
Weiter deckt die histopathologische Untersuchung des Darmes bei 3 doppelt defizienten Mäusen eine akute Blutung des Darmes auf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei allen Mäusen eine Hepatolipidose diagnostizierbar ist. Bei den GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Tieren findet man häufiger leukozytäre Infiltrationen in der Lunge, als in der Kontrollgruppe. Eine Hypertrophie der pulmonalen

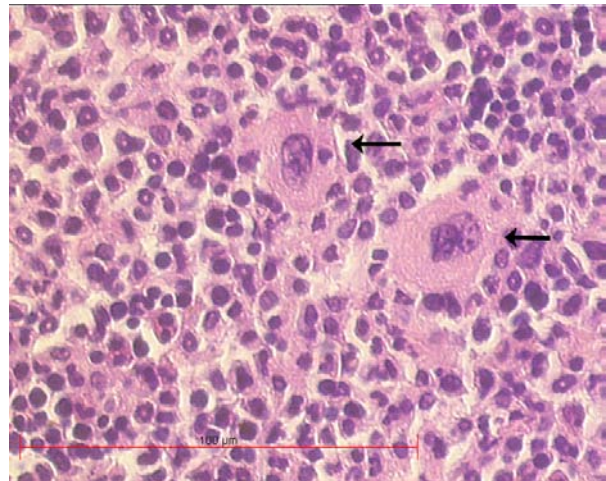
Arterien, sowie ein Lungenödem treten fast ausschließlich bei diesem Genotyp auf. Auch eine gesteigerte medulläre und extramedulläre Blutbildung ist bei doppelt defizienten Tieren zu verzeichnen. Nur bei diesen Mäusen treten akute oder chronische Blutungen auf.

Eine Übersicht fasst die histopathologischen Veränderungen zusammen, Beispiele der histologischen Schnitte sind in Abbildung 26 gezeigt.

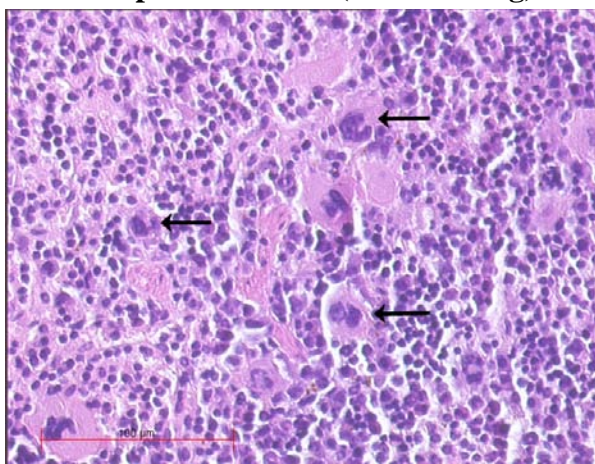
Histopathologische Veränderungen



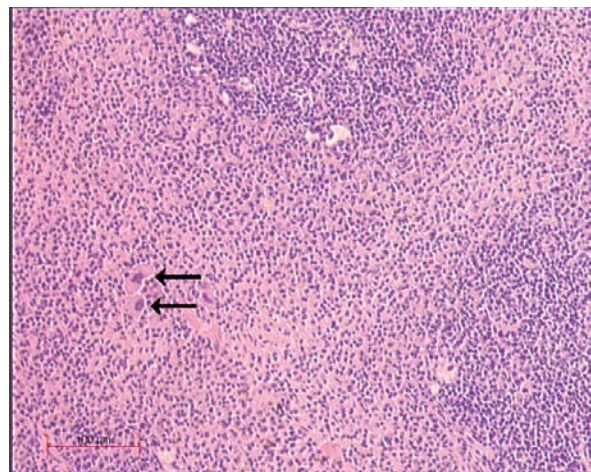
Vermehrtes Auftreten von Megakaryozyten im Knochenmark bei GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen (HE-Färbung)



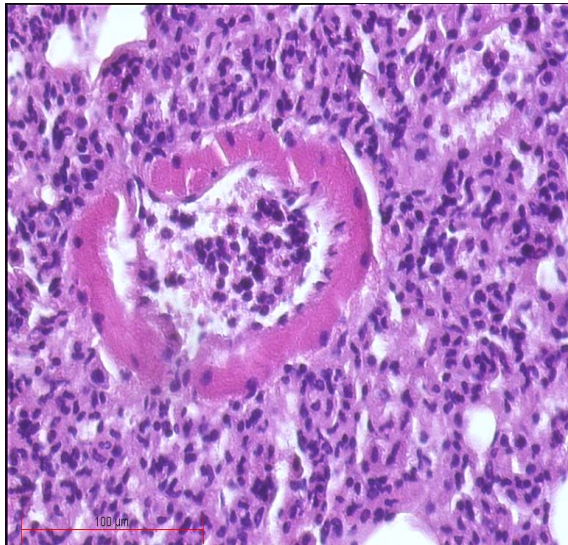
Knochenmark einer ApoE^{-/-}-Maus im Vergleich (HE-Färbung)



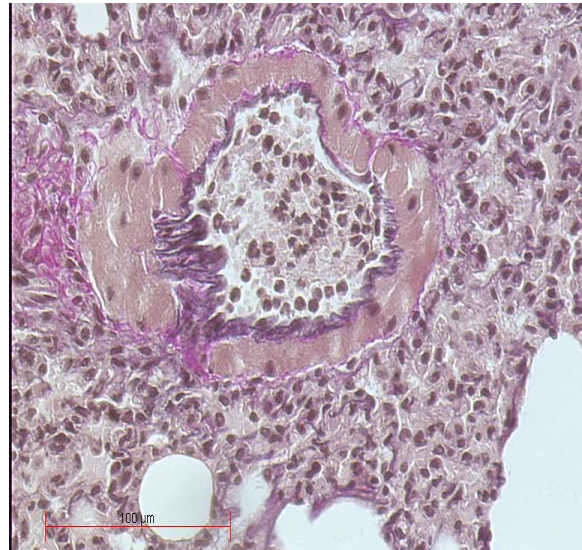
Vermehrtes Auftreten von Megakaryozaten in der Milz bei GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen (HE-Färbung)



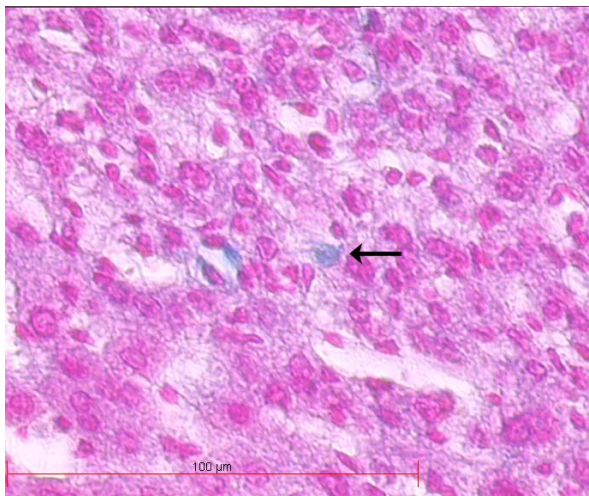
Milz einer ApoE^{-/-}-Maus im Vergleich (HE-Färbung)



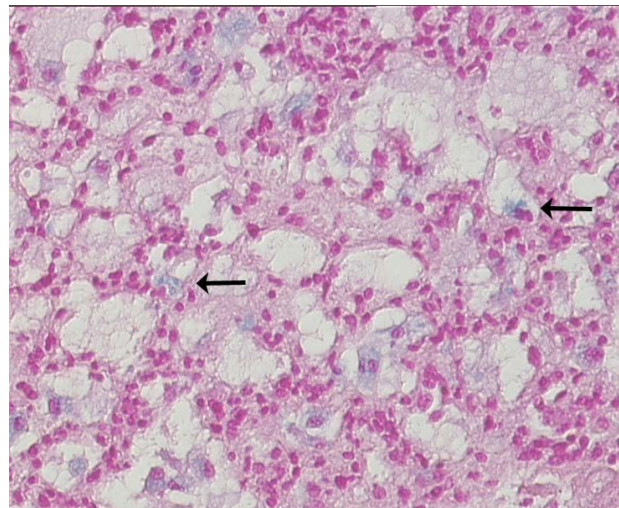
Hypertrophie der pulmonalen Arterienwand bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen (HE-Färbung)



Hypertrophie der pulmonalen Arterienwand bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen (E.v.G.-Färbung)



Hämosiderinablagerungen in der Leber einer GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus (Berliner-Blau-Reaktion)



Hämosiderinablagerungen in der Lunge einer GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus (Berliner-Blau-Reaktion)

Abbildung 26: histopathologische Veränderungen bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen

Die Photos zeigen histopathologische Veränderungen der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse; In den ersten zwei Beispielen sind zum Vergleich histologische Schnitte der Organe von ApoE-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) gegenübergestellt.

Tabelle 20: Histopathologische Befunde bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen)

Tier	Sex	Alter [Wo]	Fütterung [Wo]	Lunge: leukozytäre Infiltrationen	Lunge: Ödem	Lunge: Gefäßwand- Hypertrophie	Hepatoslipidose	Milz: extramedulläre Blutbildung	Femur: gesteigerte Blutbildung	akute Blutung	chron. Blutung	Niere: pathologischer Befund
GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}												
1	w	12	8	x	x		x	mgr.	n.a.		x (Leber / Milz)	
2	m	16	12	x		x	x	mgr.	x	x (Darm)		
3	m	16	12		x	x	x	mgr.	x	x (Darm)		
4	m	16	12	x	x	x	x	mgr.	x	x(Lunge)		
5	m	12	8	x	x		x	mgr.	x	x(Lunge)	x (Lunge)	
6	w	10	6		x	x	n.a.	mgr.	n.a.	x(Lunge)		
7	m	16	12	x		x	x	mgr.	x	x (Darm)		
8	m	12	8	x	x	x	x		x	x(Lunge)		
9	m	16	12	n.a.	n. a.	n.a.	x		x			
10	m	16	12	x		x	x	ggr.	n.a.			
11	m	12	8	x		x	x	mgr.	x	x(Lunge)		
ApoE^{-/-}												
1	w	12	8				x	ggr.				
2	w	12	8				x	ggr.				
3	m	12	8	x		x	x	ggr.				
4	m	12	8				x	ggr.				
5	m	16	12				x	ggr.				
6	m	12	8	x			x	ggr.	x			
7	m	16	12				x					
8	m	12	8	x			x	ggr.				

Abkürzungen: m: männlich
w: weiblich
mgr.: mittelgradig
ggr.: geringgradig
n.a.: nicht ausgewertet

5.3 Charakterisierung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*

Mit Hilfe der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie können Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothel im Verlauf der Atheroprogession analysiert werden. Man quantifiziert die feste Adhäsion der Blutplättchen an der Innenauskleidung der Gefäßwand. Dabei vergleicht man innerhalb der beiden Altersstufen 12 Carotiden von jeweils 6 GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}- Mäusen mit 12 Carotiden von ebenfalls 6 ApoE^{-/-}-Mäusen. Ein Vergleich zwischen den beiden Altersgruppen klärt, ob eine Zunahme der Thrombozytenadhäsion an der Gefäßwand im Verlauf der Atherosklerose auftritt.

Während der Versuche bereitet die hohe Blutungsneigung der Tiere der Versuchsgruppe Probleme. Jeweils eine GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus der beiden Altersgruppen stirbt intraoperativ, so dass die zweite A.carotis nicht evaluiert werden kann. In der späten Versuchs- und Kontrollgruppe ist bei jeweils einem Tier die Blutung zu stoppen, bei der Koagulation wird aber die A. carotis verletzt und muss deshalb von der Auswertung ausgenommen werden. Auch zwei Tiere der Kontrollgruppe versterben intraoperativ. Hieraus ergibt sich die variierende Anzahl (n=Anzahl der Aa. carotides) an angegebenen Werten.

Mit beginnender Atherosklerose beobachtet man bei 12 Wochen alten ApoE^{-/-}-Mäusen eine feste Adhäsion der Thrombozyten am Endothel. Thrombozyten treten also bei dieser Gruppe in dauerhaften Kontakt mit der Gefäßwand der Carotiden (MW+Stabw: 67 ± 88 Thrombozyten/mm²). Bei 16 Wochen alten ApoE^{-/-}-Mäusen findet man weiter eine deutlich gesteigerte Zahl von fest adhärenen Thrombozyten. So haften im Mittel 458 ± 435 Thrombozyten/mm² am Endothel der Prädilektionsstelle für Atherosklerose stationär.

Dagegen kommt es bei GPIIb-IIIa-defizienten Mäusen sowohl im Alter von 12, als auch im Alter von 16 Wochen zu einer kompletten Blockade des dauerhaften Kontaktes der Thrombozyten am Endothel. Die GPIIb-IIIa-defizienten Thrombozyten können keine feste Bindung mit der Oberfläche des dysfunktionellen Endothels eingehen, eine feste Adhäsion ist daher bei allen untersuchten Tieren unterbunden (MW+Stabw: 0 ± 0 Thrombozyten/mm²).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Thrombozyten am Gefäßendothel an Prädilektionsstellen atherosklerotischer Läsionen adhäreren. Dieser Prozess ist bei Mäusen, die GPIIb-IIIa-defiziente Thrombozyten haben, vollständig verhindert (siehe Abb.27 und 28).

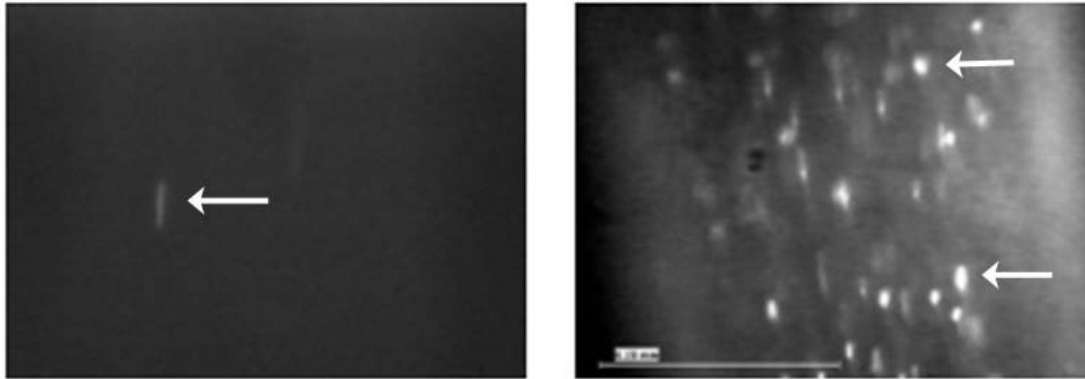


Abbildung 27: Thrombozytenadhäsion am Gefäßendothel

Die linke Momentaufnahme aus einer Videosequenz zeigt die fehlende Thrombozytenadhäsion bei GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen (Pfeil deutet auf transient adhärenen Thrombozyt). In der rechten Aufnahme einer ApoE^{-/-}-Maus (=GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}-Maus) sind eine Vielzahl fest adhärenen Thrombozyten zu sehen (Pfeile zeigen auf zwei fest adhärenen Thrombozyten).

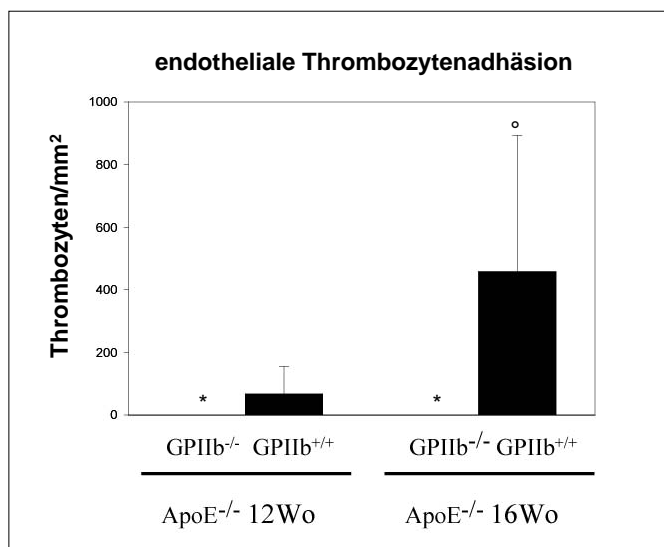


Abbildung 28: endotheliale Thrombozytenadhäsion

Das Diagramm zeigt die Zahl der fest an das Endothel adhärenen Thrombozyten bei GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.

* p<0,05 vs. GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}; ^o p<0,05 vs. 12 Wochen

Tabelle 21: Einzelwerte der intravitalmikroskopisch ermittelten fest adhärenenten Thrombozytenzahl/mm² bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen

Gruppe	12 Wochen alt		16 Wochen alt	
Genotyp	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
A.carotis 1	0	46	0	801
A.carotis 2	0	35	0	228
A.carotis 3	0	26	0	35
A.carotis 4	0	139	0	174
A.carotis 5	0	0	0	601
A.carotis 6	0	0	0	1370
A.carotis 7	0	278	0	635
A.carotis 8	0	35	0	139
A.carotis 9	0	0	0	139
A.carotis 10	0	116	0	
A.carotis 11	0			
Anzahl	n=11	n=10	n=10	n=9
Mittelwert	0	67	0	458
±Stabw	0	88	0	435

5.4 Der Ausbildungsgrad der Plaqueformation

Die Messung des plasmatischen Cholesterinspiegels gibt Hinweis auf den Grad der Veränderung des Lipidstoffwechsels. Ergebnisse aus der Erfassung der Rigidität der Gefäßwand und der Größe der atherosklerotischen Plaques spiegeln den Grad der Atherosklerose wieder. So kann die Auswirkung der Blutplättchendysfunktion bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen bestimmt werden.

5.4.1 Der plasmatische Cholesterinspiegel

Mithilfe der Messung der plasmatischen Cholesterinwerte kann ein Parameter für den Grad der Entgleisung des Lipidstoffwechsels untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass zwischen allen Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Höhe des Cholesterinspiegels im Plasma fehlt. Alle Werte liegen im Mittel zwischen $832,9 \pm 143,3$ g/dl und $1003,9 \pm 111,4$ g/dl. [Frith et al.³⁷ geben physiologische Werte im Bereich von etwa 200-300g/dl für C57Bl6/J Mäuse an].

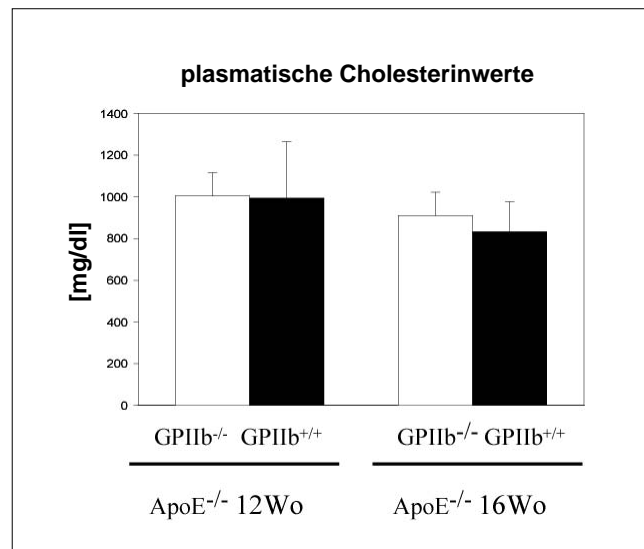


Abbildung 29: plasmatische Cholesterinwerte

Das Diagramm zeigt Cholesterinwerte von GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich mit ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}-Mäusen) nach 8-wöchiger (12 Wochen alte Tiere) und 12-wöchiger (16 Wochen alte Tiere) cholesterinreicher Diät.

Tabelle 22: plasmatische Cholesterinwerte [g/dl] von GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}-Mäusen) nach 8-wöchiger (12 Wochen alte Tiere) und 12-wöchiger (16 Wochen alte Tiere) cholesterinreicher Diät.

Gruppe	12 Wo alt		16 Wo alt	
	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Tier 1	929	772	853	1005
Tier 2	977	926	1016	951
Tier 3	949	673	1028	774
Tier 4	1004	867	996	981
Tier 5	863	1443	727	646
Tier 6	1176	1040	843	756
Tier 7	1129	1236	912	717
Anzahl	n=7	n=7	n=7	n=7
Mittelwert	1004	994	911	833
±Stabw	112	269	111	143

4.4.2 Die Rigidität der Gefäßwand

Ein duplexsonographisches Verfahren wird herangezogen, um eine Aussage über die Rigidität der Gefäßwand der Aorta abdominalis treffen zu können. Durch Plaquebildung und Intimaproliferation kommt es während der Atherogenese zu einem Elastizitätsverlust der Arterienwand, welcher den Messparameter des Resistance Index verändert.

Bei den erhobenen Werten des Resistance Index ist weder zwischen den Versuchsgruppen innerhalb einer Altersstufe, noch zwischen den beiden Altersstufen ein signifikanter Unterschied festzustellen.

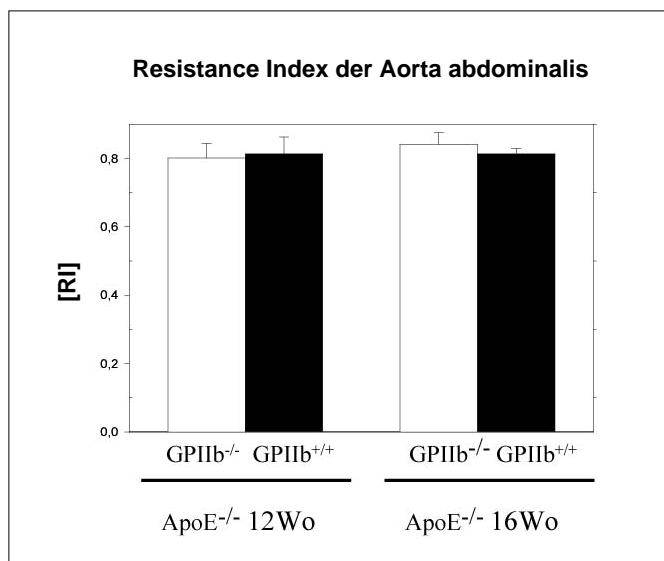


Abbildung 30: Duplexsonographie

Darstellung des Resistance Index (RI) der Aorta abdominalis bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich mit ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.

Tabelle 23: Resistance Index (RI) der Aorta abdominalis bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen

Gruppe	12 Wochen alt		16 Wochen alt	
	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Tier 1	0,77	0,8	0,82	0,79
Tier 2	0,85	0,83	0,81	0,83
Tier 3	0,84	0,76	0,83	0,82
Tier 4	0,81	0,85	0,81	0,79
Tier 5	0,77	0,88	0,9	0,83
Tier 6	0,74	0,83	0,87	0,82
Tier 7	0,83	0,74	0,85	0,81
Tier 8	0,72	0,8	0,81	0,81
Tier 9	0,84	0,84	0,77	0,81
Anzahl	n=9	n=9	n=9	n=9
Mittelwert	0,80	0,81	0,83	0,81
±Stabw	0,05	0,04	0,04	0,01

5.4.3 Morphologische Charakterisierung der Atheroprogession

Durch die sogenannte Sudan-III-Färbung können Fetteinlagerungen, die für atherosklerotische Plaques charakteristisch sind, in den Gefäßen nachgewiesen werden. Die *En-face*-Technik, bei der Gefäße abfotografiert (siehe Abb.31 und 33) und die Ausmaße der rot gefärbten Areale erfasst werden, ist ein Maß für die Größe der gebildeten Plaques (Einzelheiten siehe Abschnitt 4.5.3).

Evaluiert werden jeweils eine A. carotis und der Aortenbogen eines jeden Tieres.

Die Auswertung zeigt, dass ApoE^{-/-}-Mäuse bereits im Alter von 12 Wochen in der A. carotis und im Aortenbogen atherosklerotische Läsionen aufweisen. Die relative Plaquefläche nimmt bei dieser Altersgruppe in der A. carotis einen Wert von $14,9 \pm 12,2\%$, im Aortenbogen einen Wert von $28,0 \pm 9,6\%$ ein. Im Alter von 16 Wochen sind bei ApoE^{-/-}-Mäusen die Läsionen signifikant expandiert. So beträgt das relative Plaqueausmaß in der A. carotis $36,8 \pm 18,7\%$, im Aortenbogen $52,0 \pm 8,8\%$.

Bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen dagegen findet man schon im Alter von 12 Wochen eine tendenziell geringere Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in der A. carotis (MW+Stabw: $5,1 \pm 5,1\%$) und im Aortenbogen (MW+Stabw: $23,5 \pm 6,1\%$). In der 16-Wochen Gruppe ist eine signifikant reduzierte Plaquebildung zu erkennen. In der A. carotis beträgt die relative Plaqueexpansion $17,9 \pm 14,0\%$, im Aortenbogen $41,4 \pm 8,7\%$. Man kann also erkennen, dass

die Atheroprogression bei $\text{GPIIb}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu $\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäusen signifikant reduziert ist.

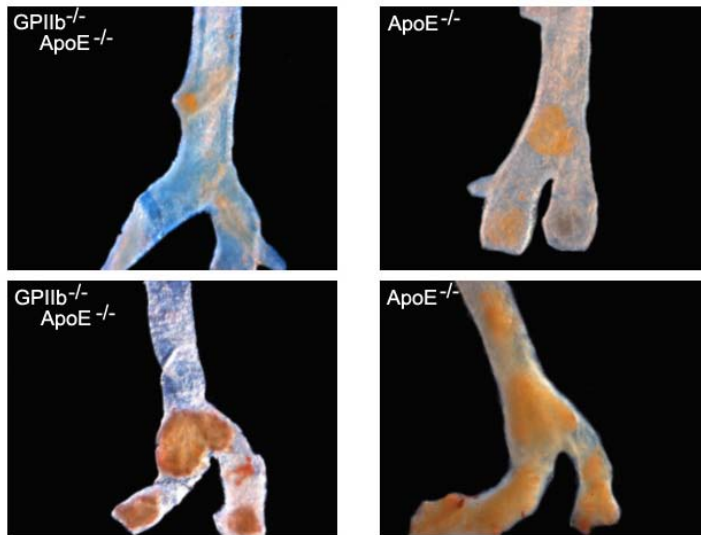


Abbildung 31: Sudan-III-Färbung der A. carotis

En-face-Photographien von Sudan-III-gefärbten Aa. carotides. Die oberen Bilder stellen das Plaquesmaß bei 12 Wochen alten Mäusen, die unteren bei 16 Wochen alten Mäusen, dar. Links ist die $\text{GpIIb}^{-/-}\text{ApoE}^{-/-}$ -Gruppe, rechts die Kontrolle ($=\text{GPIIb}^{+/+}\text{ApoE}^{-/-}$ -Mäuse) gezeigt.

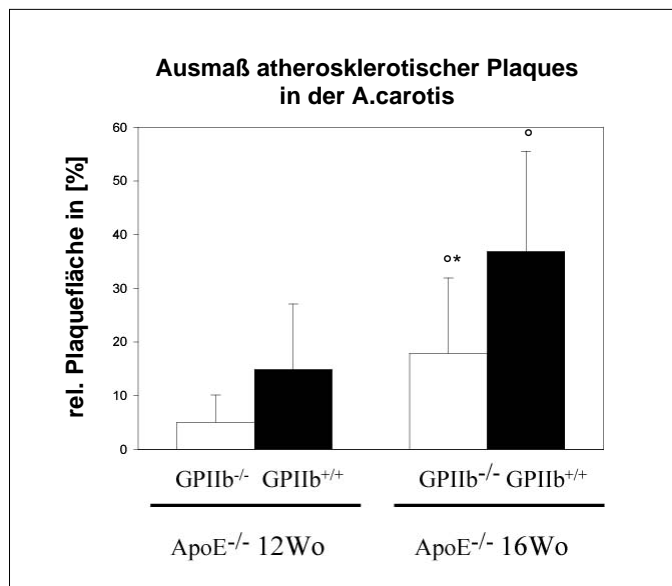


Abbildung 32: relative Plauefläche in der A. carotis

Das Diagramm zeigt die mithilfe der *En-face*-Technik ermittelte relative Plauefläche bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.

* p<0,05 vs. GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}; ° p<0,05 vs. 12 Wochen

Tabelle 24: Einzelwerte der mithilfe *En-face*-Technik ermittelten relativen Plauefläche [%] der A. carotis bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen

Gruppe	12 Wochen alt		16 Wochen alt	
	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Tier 1	6,9	35,9	3,8	6,3
Tier 2	2,5	3,0	1,4	52,9
Tier 3	15,1	25,1	32,4	21,2
Tier 4	7,8	1,0	11,3	51,6
Tier 5	1,3	25,9	11,0	45,2
Tier 6	9,4	17,2	44,0	47,6
Tier 7	0,9	12,5	20,6	44,6
Tier 8	1,2	11,0	25,8	51,4
Tier 9	0,0	2,2	11,0	10,7
Anzahl	n=9	n=9	n=9	n=9
Mittelwert	5,0	14,9	17,9	36,8
±Stabw	5,1	12,2	14,0	18,7

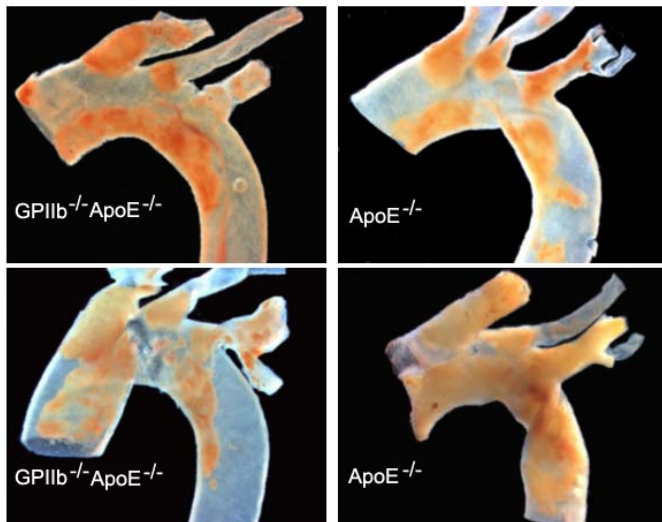


Abbildung 33: Sudan-III-Färbung des Aortenbogens

En-face-Photographien von Sudan-III-gefärbten Aortenbögen. Die oberen Bilder stellen das Plaqueausmaß bei 12 Wochen alten Mäusen, die unteren bei 16 Wochen alten Mäusen dar. Links ist die $GpIIb^{-/-} ApoE^{-/-}$ -Gruppe, rechts die Kontrolle (= $GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}$ -Mäuse) gezeigt.

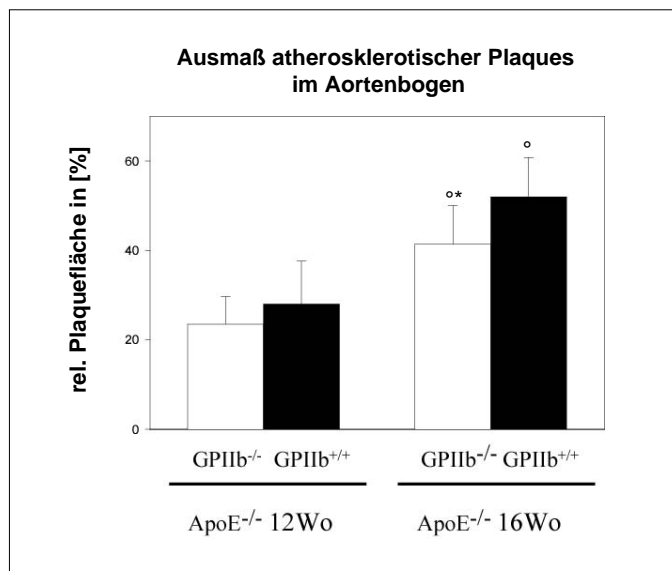


Abbildung 34: relative Plaquefläche des Aortenbogens

Das Diagramm zeigt die mithilfe der *En-face*-Technik ermittelte relative Plaquefläche bei $GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu $ApoE^{-/-}$ -Mäusen (= $GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}$ -Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.

* $p < 0,05$ vs. $GPIIb^{+/+} ApoE^{-/-}$; ° $p < 0,05$ vs. 12 Wochen

Tabelle 25: Einzelwerte der mithilfe *En-face* Technik ermittelten relativen Plaquerfläche [%] des Aortenbogens bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen

Gruppe	12 Wochen alt		16 Wochen alt	
Genotyp	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Tier 1	28,8	28,0	41,9	36,7
Tier 2	24,9	26,0	37,5	41,1
Tier 3	14,1	16,1	37,7	54,4
Tier 4	15,0	29,0	38,7	54,3
Tier 5	28,4	29,9	30,7	47,0
Tier 6	31,2	36,5	60,0	53,8
Tier 7	24,8	16,1	34,4	60,0
Tier 8	19,0	23,3	48,7	64,0
Tier 9	25,6	46,8	42,7	56,6
Anzahl	n=9	n=9	n=9	n=9
Mittelwert	23,5	28,0	41,4	52,0
±Stabw	6,1	9,6	8,6	8,8

5.4.4 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie stellt eine weitere Methode dar, die der Erfassung der Plaquergröße dient. Serielle Schnitte der Bifurkation jeweils einer A. carotis pro Tier werden angefertigt und fotografiert (siehe Abb.35). Das Ausmaß der atherosklerotischen Veränderung wird histomorphometrisch bestimmt (Einzelheiten siehe Abschnitt 4.5.4).

Auch bei dieser Methode der Evaluierung der Plaquergröße zeigt sich, dass bei der Altersgruppe der 12 Wochen alten Tiere die atherosklerotischen Veränderungen signifikant weniger fortgeschritten sind als in der älteren Gruppe.

Bei einem Vergleich innerhalb der Altersgruppen findet man bei 12 Wochen alten Mäusen tendenziell weniger Plaquer bei doppelt defizienten Mäusen (MW+Stabw: 1,6 ± 1,8%), als bei den ApoE^{-/-}-Kontrolltieren (MW+Stabw: 6,5 ± 7,3%). In der 16 Wochen alten Gruppe besteht eine signifikante Reduktion der Plaquergröße bei den doppelt defizienten Mäusen (MW+Stabw: 20,5 ± 14,1%) im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (MW+Stabw: 44,7 ± 22,8%).

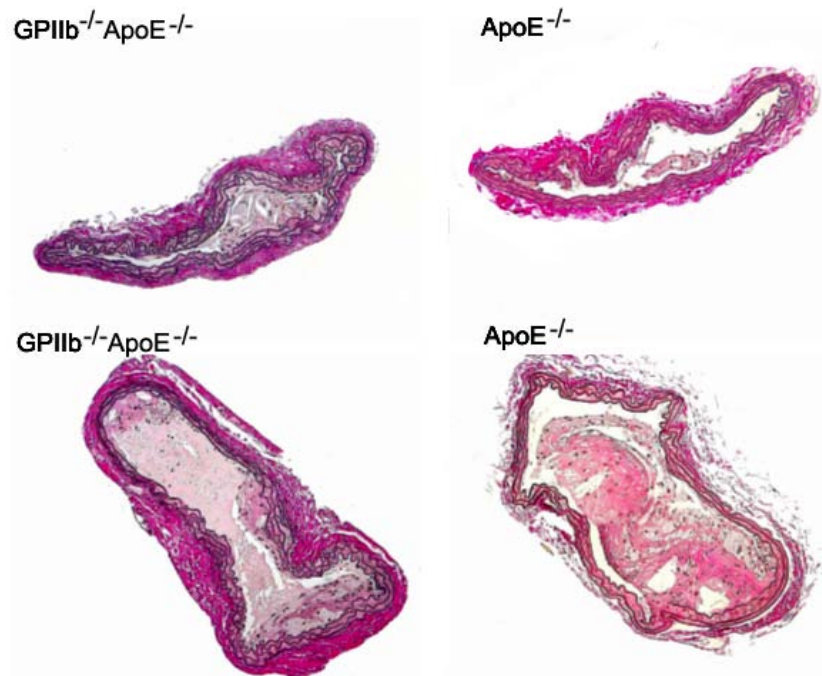


Abbildung 35: Van Giesson-Färbung des Querschnittes der Bifurkation der A. carotis

Die Bilder zeigen Querschnitte der Bifurkation der A. carotis. Die oberen Abbildungen stellen das Plaqueausmaß bei 12 Wochen alten Mäusen, die unteren bei 16 Wochen alten Mäusen dar. Links ist die GpIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Gruppe, rechts die Kontrolle (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäuse) gezeigt.

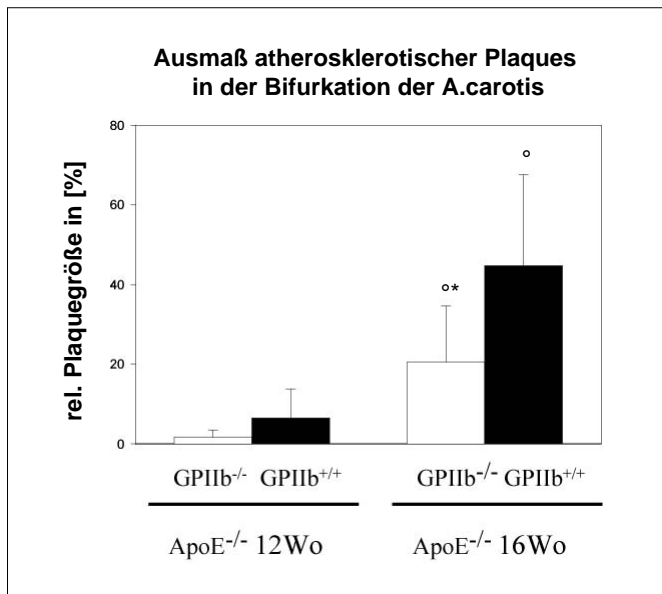


Abbildung 36: Relatives Plaqueausmaß in seriellen Querschnitten der A. carotis

Das Diagramm zeigt die relative Plaquefläche bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen, die histomorphometrisch an seriellen Querschnitten der Bifurkation der A. carotis evaluiert wurde.

* p<0,05 vs. GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}; ° p<0,05 vs. 12 Wochen

Tabelle 26: Histomorphometrisch ermittelte Einzelwerte des durchschnittlichen Wertes relativer Plaqueflächen [%]. Die Auswertung bezieht sich auf GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen (=GPIIb^{+/+}ApoE^{-/-}-Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.

Gruppe	12 Wochen alt		16 Wochen alt	
	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}	GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-}
Tier 1	1,3	8,1	2,1	74,8
Tier 2	5,0	0,6	37,0	58,9
Tier 3	2,0	17,2	27,1	41,5
Tier 4	0,0	1,7	10,6	51,2
Tier 5	1,3	1,0	30,5	8,5
Tier 6	0,3	15,5	30,8	33,2
Tier 7		1,1	5,4	
Anzahl	n=6	n=7	n=7	n=6
Mittelwert	1,7	6,5	20,5	44,7
±Stabw	1,8	7,3	14,1	22,8

6 DISKUSSION

Bei der Atherosklerose liegt zwischen dem Beginn der arteriellen Gefäßveränderung und der klinischen Ausprägung der Erkrankung eine sehr lange Periode. Frühe Stadien atherosklerotischer Läsionen können sogar schon während der fetalen Entwicklung beobachtet werden^{25,104,105}. Die lange Zeitspanne der prodromalen Phase ermöglicht präventive Maßnahmen, die nur verbessert werden können, wenn die Pathomechanismen der Initiation und Progression früher atherosklerotischer Läsionen weitgehend geklärt sind.

In späten Phasen der Atherosklerose führen Desquamation von Endothelzellen im Bereich der Läsion, Ruptur der fibrösen Kappe der Plaques oder Zerreißung von Blutgefäßen innerhalb von Plaques zu Hmostasen und Thrombusformation¹⁵⁵. Hierbei aktivierte Thrombozyten geben proinflammatorische Stoffe in das Mikromilieu ab und beteiligen sich so an der Unterhaltung des chronisch-inflammatorischen Prozesses.

Doch die Adhäsion von Thrombozyten kann auch schon in sehr frühen Phasen der Atherogenese beobachtet werden. Dabei nehmen die Blutplättchen direkten Kontakt zu Endothelzellen auf. Dieser Prozess wird durch das thrombozytäre Glykoprotein GPIIb-IIIa vermittelt^{51,85}. Auch die Adhäsion an Endothelzellen geht mit einer Aktivierung der Thrombozyten einher und befähigt sie zur Abgabe proinflammatorischer Substanzen^{85,91}.

In der vorliegenden Arbeit hilft ein neu etabliertes Tiermodell die Bedeutung der GPIIb-IIIa-medierten Adhäsion für die Atherogenese zu beurteilen. Bei der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus evaluiert man zunächst die Thrombozyt-Endothel-Interaktion *in vivo*, und stellt dann den Einfluss der Thrombozyten-Adhäsion auf den Ausprägungsgrad des atherosklerotischen Plaques dar.

6.1 Die angewandten experimentellen Verfahren

6.1.1 Das Tiermodell

Um die Rolle von Thrombozyten in komplexen pathologischen Abläufen, wie der Atherogenese, bestimmen zu können, müssen *In-vitro*-Verfahren durch Untersuchungen am

Tiermodell ergänzt werden. Das Tiermodell ermöglicht es, das Verhalten der Blutplättchen und Gefäße *in vivo* zu beurteilen und die Beeinflussung der Atherogenese histologisch darzustellen.

6.1.1.1 Wahl des Mausmodells

Die ApoE^{-/-}-Maus, ein Mausmodell für Atherosklerose, bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Tiermodellen. Erstens ist dieses häufig angewandte Tiermodell gut charakterisiert, zweitens vereinfachen die kurze Generationszeit und unkomplizierte Haltung die Studienplanung^{72,116,118}. Überdies weist die ApoE^{-/-}-Maus eine dem Menschen sehr ähnliche atheroprogressive Entwicklung auf^{102,125,167}. Zudem stellt die ApoE^{-/-}-Maus ein Modell der frühen Atherosklerose dar, denn Stadien der Plaqueruptur können nicht beobachtet werden^{14,102}. Es bietet sich daher an, auf dieses Maus-Modell zurückzugreifen, da in der vorliegenden Arbeit vor allem die Initiation und frühe Progression der Atherosklerose betrachtet werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der genetischen Manipulierbarkeit der Maus. So konnte eine Maus mit spezifischen Rezeptormangel, die GPIIb^{-/-}-Maus, generiert werden und diese erstmals innerhalb der vorliegenden Arbeit in die ApoE^{-/-}-Maus eingekreuzt werden. Ein zusätzlicher vorteilhafter Aspekt liegt in der Größe der Maus. Denn die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wird durch die Schichtdicke des zu durchdringenden Gewebes limitiert. Die Gefäßwand der großen, herznahen Arterien einer Maus ist jedoch so dünn, dass Thrombozyt-Zellwand-Interaktionen von der Adventitia aus beobachtet werden können. Bei größeren Tierarten wäre dies nicht mehr möglich⁸⁷.

6.1.1.2 Die Etablierung der GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Maus als neues Tiermodell

GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse erscheinen im Alter bis zu 2 Monaten überwiegend gesund und erreichen ein vergleichbares Körpergewicht wie ApoE^{-/-}-Mäuse und C57Bl6/J Mäuse. Aufgrund der erhöhten Blutungsneigung tritt jedoch eine gesteigerte Sterblichkeit der Mäuse dieses Stammes auf. Die häufigste Todesursache scheint dabei die hämorrhagische Krise nach Traumata und Geburt zu sein.

Wie mithilfe der Durchflusszytometrie, PCR und Gelelektrophorese gezeigt werden kann, exprimieren GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse den GPIIb-IIIa-Komplex nicht auf der thrombozytären Oberfläche. Bei Knock-out-Mäusen ist daher eine Thrombozytenaggregation mit

Zellvernetzung über Fibrinogenbrücken zwischen zwei GPIIb-IIIa-Komplexen nicht möglich. In der Rotations-Thrombelastographie weisen sie aus diesem Grund eine verlängerte Gerinnsel-Bildungszeit und eine verminderte Thrombusfestigkeit auf. Ihre Blutungszeit ist stark verlängert und eine vollständige Blutstillung kommt oft nicht zustande. Die Expression der thrombozytären Membranrezeptoren GPVI, GPIb-V-IX und P-Selektin ist durch das Fehlen der GPIIb-IIIa-Komplexe dagegen nicht beeinflusst.

Der Mangel an GPIIb-IIIa ist also mit einer gestörten Thrombozytenaggregation und einer beeinträchtigten Hämostase assoziiert. Dies spiegelt sich in der Analyse der Blutparameter wider, die zeigt, dass doppelt defiziente Tiere einen verringerten Hämatokritwert bei deutlich vermindertem Hämoglobingehalt aufweisen. Eine gesteigerte medulläre und extramedulläre Blutbildung weist zusätzlich darauf hin, dass es sich um eine aus chronisch-rezidivierenden Blutungen resultierende regenerative Anämie handelt. Die in den pathologischen Untersuchungen nachweisbaren Petechien, Ekchymosen und Einblutungen in Körperhöhlen und Organe unterstützen die Hypothese, dass periodisch wiederkehrende Blutverluste die Anämie bedingen. Die Thrombozytenzahl der Mäuse erweist sich dagegen als unverändert.

Neben Blutungen sind bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen leukozytäre Infiltrationen in der Lunge zu beobachten. Diese sind möglicherweise auf eine Abräumreaktion nach pulmonalen Einblutungen zurückzuführen, obwohl nur bei einem Tier der Nachweis von Hämosiderinablagerungen im Lungengewebe gelingt. Auch bei ApoE^{-/-}-Mäusen treten nach cholesterinreicher Diät diskrete pneumonische Infiltrate auf¹⁶⁶. Für den gesteigerten Grad an Ausprägung der Pneumonien bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen mögen daneben andere, bislang nicht genauer definierte immunologische Funktionen des GPIIb-IIIa von Bedeutung sein. So ist für GPIIIa^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse, die eine Defizienz der β_3 -Kette des GPIIb-IIIa-Komplexes aufweisen, eine ausgeprägte, nicht-infektiöse Pneumonie beschrieben¹⁶⁶.

Neben Veränderungen, die für die GPIIb-IIIa-Defizienz spezifisch sind, zeigen GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse den ApoE^{-/-}-Mäusen vergleichbare Befunde. Zu erwähnen sind ein stark erhöhter plasmatischer Cholesterinspiegel nach cholesterinreicher Fütterung, Alopezie, Pachydermie, Juckreiz und Exkorationen, sowie Cholesteatome und atherosklerotische Läsionen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse der Glanzmann Thrombasthenie ähnliche Symptome aufweisen. Zusätzlich tragen sie den Phänotyp von ApoE^{-/-}-Mäusen.

Da der GPIIb Rezeptor ausschließlich auf Thrombozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, eignet sich das hier vorgestellte Tiermodell besonders, die Rolle der Blutplättchen in der Atheroprogression zu untersuchen.

6.1.2 Charakterisierung der Blutplättchen-Endothel-Interaktion

Die Atherosklerose beschreibt einen chronisch-inflammatorischen Prozess der Gefäßintima, der sich durch die Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen auszeichnet. Initiale Mechanismen an atherosklerotischen Prädilektionsstellen, die Chemotaxis und Transmigration von Monozyten mit sich bringen, sind jedoch bislang weitgehend ungeklärt.

In dieser und vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe kann mithilfe der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie dargelegt werden, dass sehr früh im Rahmen der Atheroprogression Thrombozyten am dysfunktionellen Endothel adhären. Vergleichbar der Adhäsion von Leukozyten¹⁴³ können zwei Formen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beobachtet werden, die initiale, transiente Interaktion („Thrombozyten-Rolling“, „Thrombozyten-Tethering“) und die irreversible, feste Adhäsion. Sowohl thrombozytäres P-Selektin, als auch GPIb-V-IX können erste lockere Kontakte des Thrombozyten^{85,87} zum Endothel vermitteln. Sie rollen aber aufgrund des hohen arteriellen Strömungswiderstandes auf dem endothelialen Zellrasen weiter. Es ist anzunehmen, dass dieser initiale Kontakt das GPIIb-IIIa-Integrin aktiviert, welches dann die feste Adhäsion am Endothel mediiert¹¹³.

Der GPIIb-IIIa-Komplex ist mit etwa 50000 Kopien der häufigste thrombozytäre Adhäsionsrezeptor. Seine Funktionen umfassen die Fibrinogenbrückenbildung während der Aggregation^{61,120}, vor allem aber auch die stationäre Anheftung des Blutplättchens an intaktes Endothel^{11,126,150} und die Signaltransduktion nach Agonistenbindung^{97,139}. Der Rezeptor mediiert also die Adhäsion von Thrombozyten an dysfunktionelles Endothel^{11,126,146,150} und triggert über Outside-In Signaling die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Substanzen^{41,42,91,97,138,139}.

Frühere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Blockade von GPIb-V-IX zu einer deutlichen Reduktion der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion während der Atherogenese führt und eine signifikant verminderte Atheroprogression verursacht⁸⁵. Die vorliegende Arbeit kann erstmals *in vivo* darstellen, dass die Defizienz des GPIIb-IIIa-

Komplexes die Thrombozytenadhäsion am dysfunktionellen Endothel vollständig inhibiert. Außerdem gelingt es nachzuweisen, dass die Expression der Membranglykoproteine GPVI, GPIb-V-IX und P-Selektin unverändert ist, so dass die beobachteten Alterationen der Thrombozytendynamik auf den Verlust des GPIIb-IIIa-Rezeptorkomplexes zurückzuführen sind. Zusätzlich kann erstmals dargestellt werden, dass die Defizienz des GPIIb-IIIa durch die totale Blockade der festen thrombozytären Adhäsion eine drastische Reduktion der Atheroprogression bewirkt. So kann das Membranglykoprotein GPIIb-IIIa als wichtiger Vermittler einer proinflammatorischen Funktion während der Atherogenese identifiziert werden.

6.1.3 Charakterisierung des Ausprägungsgrades der atherosklerotischen Läsion

In der vorliegenden Arbeit entwickeln ApoE^{-/-}-Mäuse nach 6- und 8-wöchiger cholesterinreicher Diät atherosklerotische Läsionen. Sie entsprechen den in der Literatur publizierten Daten zur Atheroprogression bei diesem Tiermodell^{102,147}.

Im Gegensatz dazu weisen GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse eine stark reduzierte Atheroprogression auf.

Die Bestimmung der plasmatischen Cholesterinwerte bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen zeigt, dass die cholesterinreiche Diät das plasmatische Cholesterinniveau um das 3-4fache steigert. Da aber das Niveau des plasmatischen Cholesterins bei allen Gruppen gleich ist, legen die Ergebnisse zudem dar, dass die thrombozytäre GPIIb-IIIa-Defizienz den Grad der Entgleisung des Lipidstoffwechsels nicht beeinflusst.

Die duplexsonographische Untersuchung erlaubt eine nicht-invasive Beurteilung des funktionellen Gefäßzustandes. Mit zunehmender Rigidität der Gefäßwand und Stenosenbildung nimmt der Strömungswiderstand der Aorta zu. Dieser ist durch die Messung des Resistance Index quantifizierbar und spiegelt möglicherweise den Ausprägungsgrad der Atherosklerose wider^{50,54,85}. Doch steigern auch andere Faktoren, wie die veränderte erythrozytäre Oxygenierung bei hohen plasmatischen Cholesterinwerten^{15,144,145} oder ein niedriger Hämatokrit¹⁸, die Flussgeschwindigkeit in der Aorta. In den hier vorliegenden Untersuchungen kann in den zwei unterschiedlichen Altersgruppen kein signifikanter Unterschied des Resistance Index bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen und ApoE^{-/-}-Mäusen dargestellt werden. Der gemessene Gefäßwiderstand übersteigt dennoch deutlich physiologische Werte

gesunder C57Bl6/J-Mäuse, die in vorangegangenen Arbeiten erfasst wurden⁵¹. Eine zu geringe Sensitivität der Methode, gleichwie eine eventuell schwankende Korrelation zwischen Gefäßwiderstand und Grad der atherosklerotischen Läsion bedingen möglicherweise diese Resultate. Das Vorliegen von Anämie bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen verursacht womöglich eine Zunahme des Resistance Index trotz protrahierter Atheroprogression.

Die Sudan-III-Färbung eines gesamten Gefäßabschnittes, gleichwie histologische serielle Querschnitte im Bereich atherosklerotischer Prädilektionsstellen sind verlässliche Methoden der Plaquequantifizierung^{102,115,118,125,147}. In vorliegender Arbeit erhobene Daten aus beiden Verfahren zeigen, dass bei GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäuse das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen drastisch reduziert ist.

Dies ist bedingt durch die Inhibition der festen Adhäsion am dysfunktionellen Endothel an Prädilektionsstellen der Atherosklerose. Denn aufgrund des Unvermögens der Thrombozyten bei Aktivierung stationär zu adhären, können sie proinflammatorische Substanzen nicht in das Mikromilieu abgeben und heterotypische Zell-Zell-Interaktionen mit Leukozyten medieren. Daher vermögen GPIIb-IIIa defiziente Thrombozyten es nicht, lokale, punktuelle Entzündungen der Gefäßwand zu initiieren, die zu einer vermehrten Rekrutierung von Monozyten führen.

6.1.4 Einfluss der Thrombozytenadhäsion auf die Atheroprogression

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie auch Daten aus früheren Untersuchungen^{85,89,90} der eigenen Arbeitsgruppe lassen die Schlussfolgerung zu, dass Thrombozyten eine elementare Rolle in der Initiierung und Progression der Atherogenese spielen. Sie führen zu der Hypothese, dass Thrombozyten nicht nur bei thrombotischem Gefäßverschluss nach Plaqueruptur, sondern in allen Stadien der Atherogenese maßgeblich beteiligt sind.

An Prädilektionsstellen der Plaqueformation verursachen hohe Geschwindigkeiten und Verwirbelungen des Blutflusses einen mechanischen Reiz auf das Endothel. Zusätzlich beeinträchtigen Faktoren, wie akkumulierte modifizierte Lipoproteine, die Innenauskleidung der Gefäße^{3,22,98,106}. Das Endothel verliert dadurch seinen antithrombotischen Zustand und erleichtert die Anlagerung von Leukozyten und Thrombozyten^{19,31,38,46,48,149}.

Initiale Kontakte mit dem Endothel geht der Thrombozyt über den GPIb-V-IX-Rezeptor ein^{4,129,131}, der nach Bindung an Agonisten den GPIIb-IIIa-Komplex aktiviert⁶⁹. Der auf dem Endothel rollende Thrombozyt kann über die Vermittlung des GPIIb-IIIa-Rezeptors auf dem Endothel zum Halt kommen. Das somit fest adhärenente Blutplättchen kann nun lokal proinflammatorische Signale senden. Endothelzellen reagieren hierauf mit zunehmender Dysfunktion, glatte Muskelzellen mit vermehrter Proliferation und Leukozyten, vor allem Monozyten, mit zunehmender Adhäsion und Transmigration^{42,52,59,77}. Die feste Bindung von Thrombozyten an den endothelialen Zellrasen scheint also einen bedeutenden Faktor darzustellen, der die Initiierung der Atherosklerose triggert und den Prozess unterhält. Die vorliegende Arbeit initiiert daher die im Folgenden schematisch gezeichnete Vorstellung der Atherogenese (siehe Abb. 37 bis 41 im Vergleich zu Abb.4 bis 8).

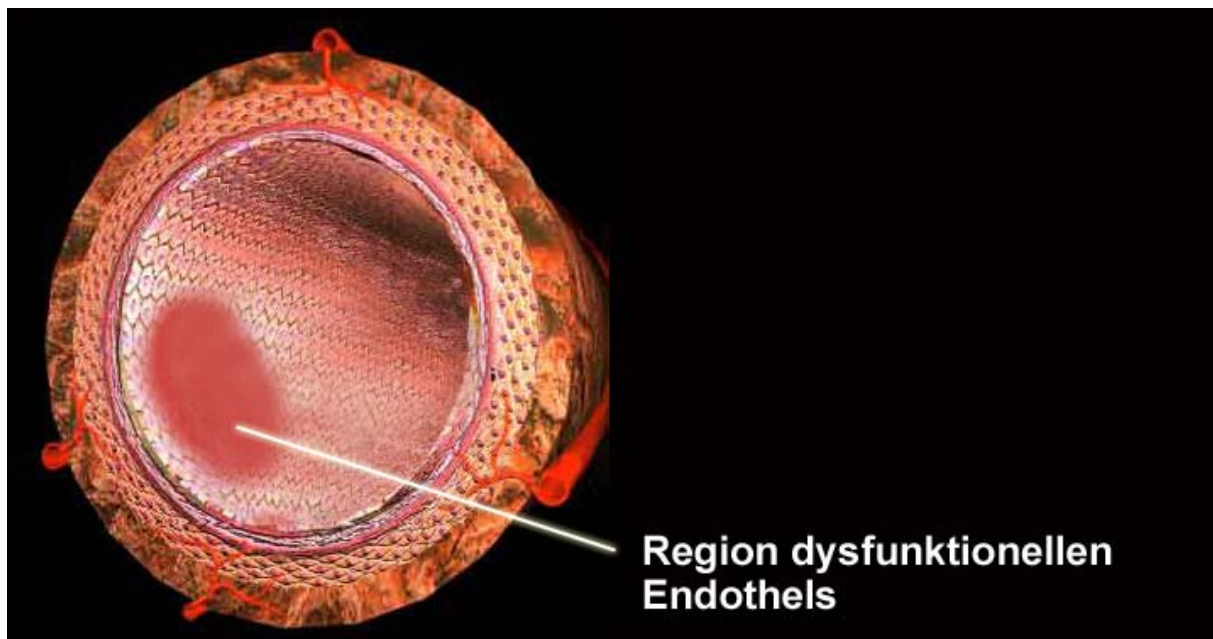


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation

Nach Einwirken mechanischer und chemischer Reize entsteht eine Region dysfunktionellen Endothels [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

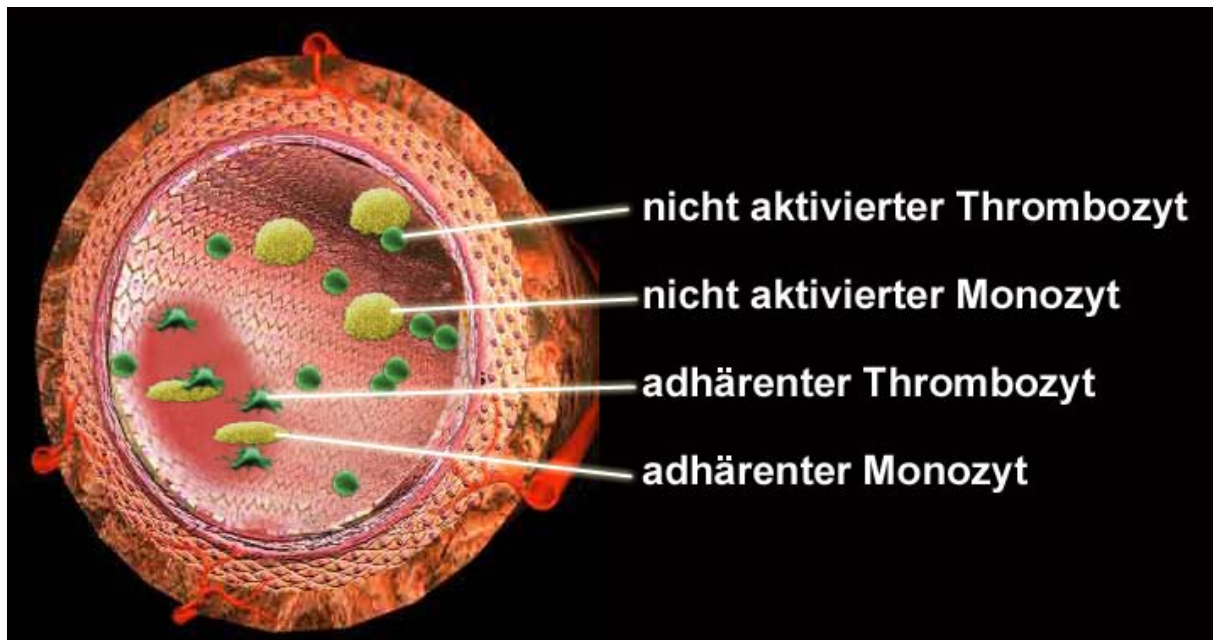


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation

Thrombozyten adhäreren an dysfunktionellen Endothelzellen. Aktivierte Thrombozyten geben dabei lokal proinflammatorische Substanzen ab und aktivieren dadurch das Endothel. Monozyten können nun ebenfalls am Endothel adhäreren und durch das Endothel in die Gefäßintima transmigrieren [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

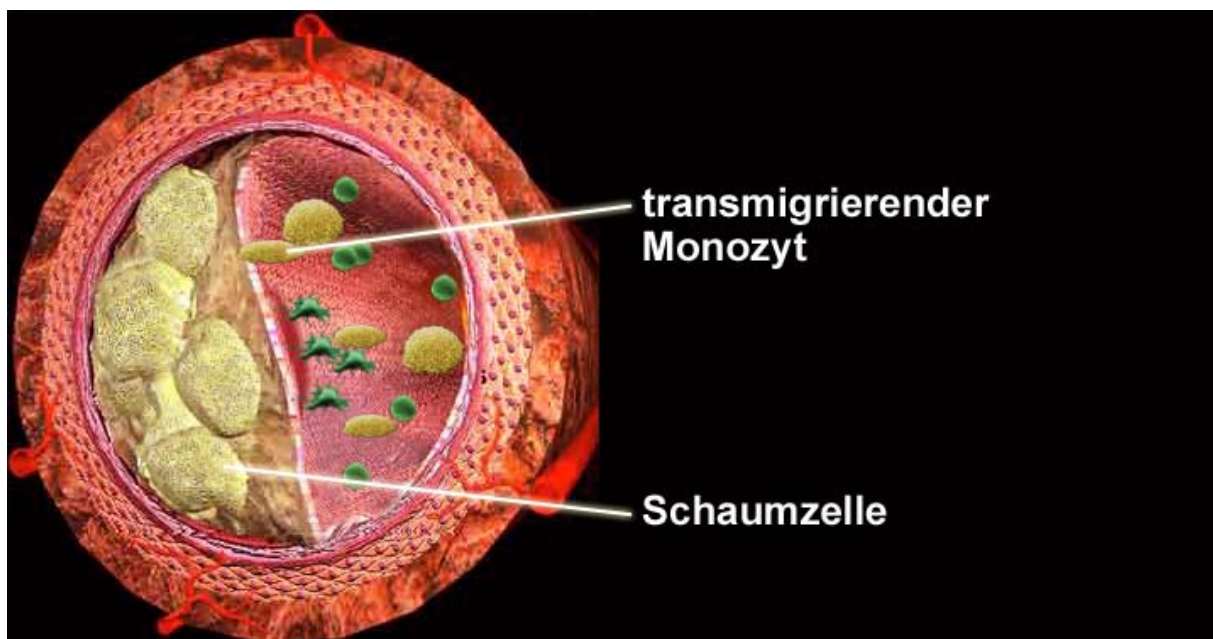


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Atherogenese: Stadium der „Fatty Streaks“

Transmigrierte Monozyten haben als Makrophagen modifizierte Lipoproteine aufgenommen und sich dadurch zu Schaumzellen entwickelt. Weiterhin adhäreren Blutplättchen am Endothel und fördern den entzündlichen Prozess [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

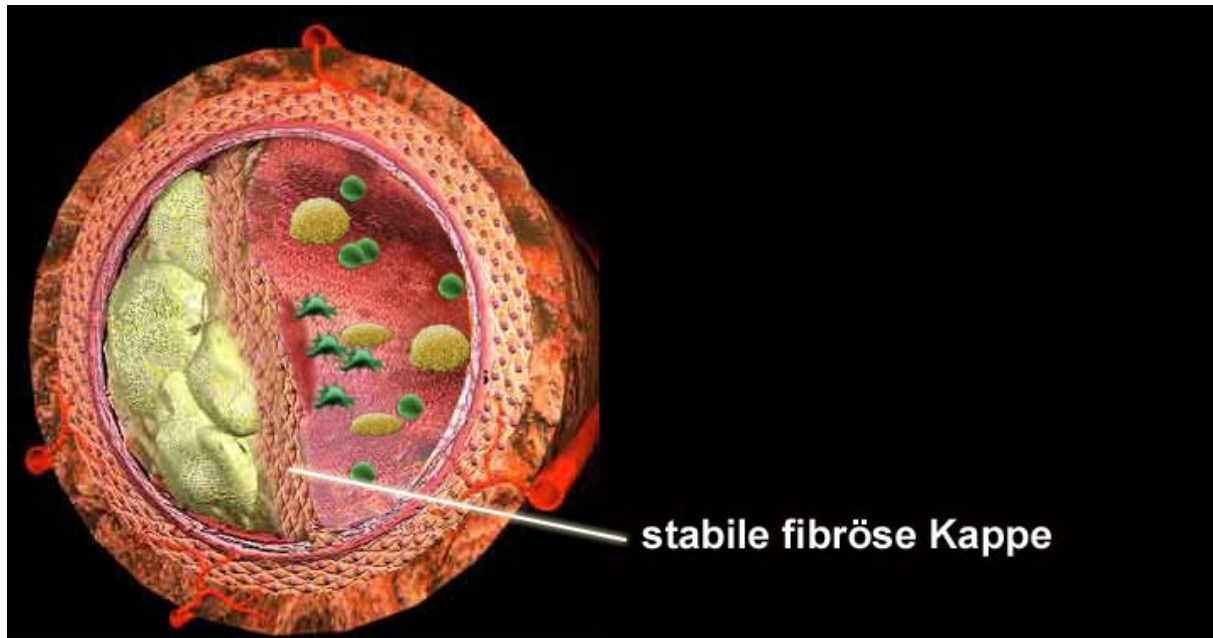


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Atherogenese Stadium der stabilen fibrösen Kappe

Auch aktivierte adhärenente Thrombozyten fördern die Akkumulation und Proliferation glatter Muskelzellen. Dies führt zur Bildung einer fibrösen Kappe, die Schaumzellen und das nekrotische Zentrum einschließt [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

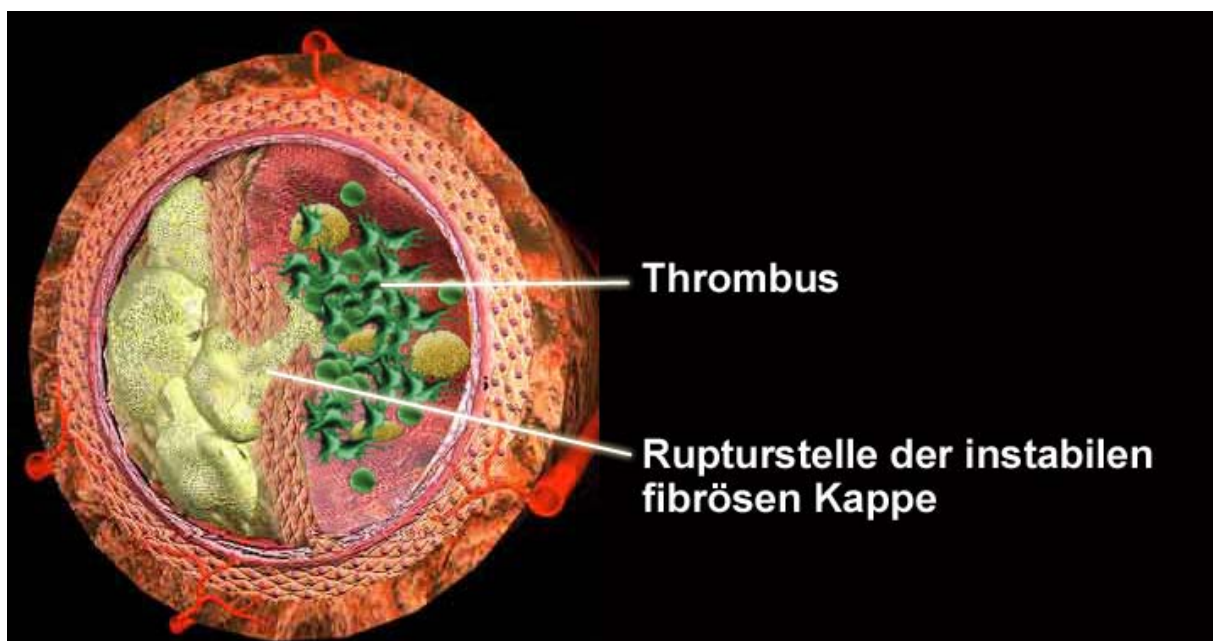


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Atherogenese: Ruptur der fibrösen Kappe

Verminderte Matrixsynthese der Muskelzellen und proteolytische Aktivität der Makrophagen können zu einer Ruptur der Kappe führen. An der Rupturstelle bildet sich ein Thrombus [stark modifiziert nach der Homepage „the Internet Stroke Center“ (<http://www.strokecenter.org>)].

6.1.5 Ausblick

Ein umfassendes Verständnis pathologischer Prozesse der Atherosklerose ist Basis für adäquate präventive Strategien.

Diese Arbeit, neben vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe, etabliert die maßgebliche Beteiligung von Blutplättchen an initialen Mechanismen der Atherosklerose. Sie identifiziert zudem das Membranglykoprotein GPIIb-IIIa als ausschlaggebenden Vermittler der proinflammatorischen Funktion der Thrombozyten.

Daraus resultieren neue Angriffspunkte für medikamentöses Eingreifen, die eine Prüfung der Anwendungsschemata bereits zugelassener GPIIb-IIIa-Antagonisten, aber auch die Entwicklung neuer Medikamente verlangen.

Das Verständnis von Thrombozyten als inflammatorische Zellen mit maßgeblicher Beteiligung an chronisch-entzündlichen Erkrankungen fordert eine neue Generation von antithrombotischen Substanzen, die gezielt proinflammatorische thrombozytäre Funktionen inhibieren ohne hämostatische Mechanismen zu beeinträchtigen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei thrombembolischen Komplikationen der späten Atherosklerose. Ruptur und Erosionen fortgeschrittener Läsionen führen zu einer Aktivierung von Thrombozyten, Aggregation und Thrombusformation und lösen akutes Koronarsyndrom, Herzinfarkt oder Schlaganfall aus.

Es bleibt jedoch zu zeigen, welche Rolle Thrombozyten in der initialen Phase der Atherosklerose einnehmen.

Der inflammatorische Prozess der Atherogenese beginnt mit einer Dysfunktion des Endothels. Thrombozyten können so an Endothelzellen adhären und nach Aktivierung proinflammatorische Substanzen, wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, in das Mikromilieu abgeben. Diese Stoffe regen Endothelzellen und glatte Muskelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen an und induzieren einen inflammatorischen, endothelialen Phänotyp, der die konsekutive Rekrutierung von Monozyten begünstigt.

Eine sehr früh im Rahmen der Atherogenese stattfindende Thrombozytenadhäsion könnte damit wesentlich an der Initiierung und Aufrechterhaltung des chronisch-inflammatorischen Prozesses der Atherosklerose beteiligt sein.

Um dies belegen zu können, wurden Versuche an ApoE^{-/-}-Mäusen durchgeführt, die zusätzlich eine Defizienz der α_{IIb} -Kette des GPIIb-IIIa-Rezeptors aufweisen. Der GPIIb-IIIa-Komplex ist ein ausschließlich thrombozytäres Membranglykoprotein, das die feste Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen vermittelt.

Es gelang der Nachweis, dass Thrombozyten von GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-Mäusen, im Gegensatz zu ApoE^{-/-}-Mäusen, am Endothel atherosklerotischer Prädilektionsstellen nicht adhären können. Die Defizienz des GPIIb-IIIa-Rezeptors führte zu einer drastischen Verminderung der atherosklerotischen Läsionen.

Die vorliegende Arbeit zeigt damit erstmals, dass Blutplättchen maßgeblich an der Initiierung der Atherosklerose beteiligt sind und identifiziert den GPIIb-IIIa-Rezeptor als bedeutenden Mediator der thrombozytären, proinflammatorischen Mechanismen.

Die Erkenntnis der pathophysiologischen Relevanz der Blutplättchen in der frühen Atherosklerose könnte die Grundlage für die Entwicklung neuer, therapeutischer Strategien darstellen.

8 SUMMARY

The role of platelets in early atherogenesis: an *in vivo* study in the GPIIb/ApoE knock-out mouse

Platelets play an important role in thrombotic vascular occlusion of late atherosclerosis. Rupture and erosion of advanced lesions lead to platelet activation, aggregation and thrombus formation and provoke acute coronary syndromes or cerebral infarction.

The inflammatory process of atherogenesis starts out with dysfunctional endothelium. Platelets may then adhere directly to the intact endothelial monolayer and release proinflammatory substances, such as cytokines, chemoattractants and growth factors. These mediate an enhanced expression of adhesion molecules and chemokines by endothelial and smooth muscle cells and therefore induce an inflammatory endothelial phenotype, which allows consecutive recruitment of monocytes.

Thus, platelet adhesion in the very early stages of atherosclerotic lesion formation may play a pivotal role in the initiation and progression of chronic inflammatory processes in atherogenesis.

To test this motive, we used a mouse model of ApoE^{-/-} mice, which are additionally characterized by the deficiency of the α_{IIb} -chain in the GPIIb-IIIa complex. GPIIb-IIIa integrin is exclusively expressed by platelets and mediates firm platelet adhesion to the endothelium.

The data presented here demonstrate, that platelet adhesion to the intact endothelial monolayer of lesion-prone sites in GPIIb^{-/-}ApoE^{-/-}-mice, in contrast to ApoE^{-/-} mice, is completely abolished. Deficiency of the GPIIb-IIIa receptor dramatically reduces atherosclerotic lesion formation even before endothelial denudation occurs.

Here we show for the first time *in vivo*, that platelets play a pivotal role in the initiation of atherosclerosis. Furthermore, the GPIIb-IIIa integrin is identified as an important mediator of platelet inflammatory mechanisms.

These findings help to understand the pathophysiological relevance of platelets in early events of atherogenic processes and may give ground to the development of new, therapeutical strategies.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adler A, George J, Keren G. The role of cytokines secreted by T cells in the pathogenesis of angina pectoris. *Harefuah* 2003;142:612-5, 645.
2. Allain C, Poon L, Chan C, Richmond W, Fu P. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.
3. Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 1996;93:1647-1650.
4. Andre P, Denis CV, Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 2000;96:3322-3328.
5. Barthels M, von Depka M. Das Gerinnungskompandium: Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
6. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 2000;89:160-167.
7. Becker KD, Gottshall KR, Kenneth RC. Strategies for Studying cardiovascular phenotypes in genetically manipulated mice. *Hypertension* 1996;27:495-501.
8. Behnke O. The morphology of blood platelet membrane systems. *Ser Haematol* 1970;3:3-16.
9. Berlanga O, Tulasne D, Bori T, Snell DC, Miura Y, Jung S, Moroi M, Frampton J, Watson SP. The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem* 2002;269:2951-2960.
10. Bolhuis PA, Sakariassen KS, Sixma JJ. Adhesion of blood platelets to human arterial subendothelium: role of factor VIII-Von Willebrand factor. *Haemostasis* 1979;8:312-323.
11. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha v beta 3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998;187:329-339.
12. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963;168:178-195.
13. Bout D, Joseph M, Pontet M, Vorng H, Deslee D, Capron A. Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science* 1986;231:153-156.
14. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996;272:685-688.

15. Buchwald H, Menchaca HJ, Michalek VN, Rohde TD, Hunninghake DB, O'Dea TJ. Plasma cholesterol: an influencing factor in red blood cell oxygen release and cellular oxygen availability. *J Am Coll Surg* 2000;191:490-497.
16. Calatzis A, Schramm W, Spannagl M. Management of Bleeding in Surgery and Intensive Care. In: Scharrer I, Schramm W, eds. *31st Hemophilia Symposium Hamburg 2000*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2002:59.
17. Capron L. New concepts of atherogenesis. *Presse Med* 1988;17:980-984.
18. Carallo C, Pujia A, Irace C, De Franceschi MS, Motti C, Gnasso A. Whole blood viscosity and haematocrit are associated with internal carotid atherosclerosis in men. *Coron Artery Dis* 1998;9:113-117.
19. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997;30:325-333.
20. Charo I, Kieffer N, Phillips D. Platelet Membrane Glycoproteins. In: Colman R, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994.
21. Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation* 1996;93:1740-1746.
22. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 1992;89:10-18.
23. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 2001;107:255-264.
24. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1255-1262.
25. D'Armiento FP, Di Gregorio F, Ciafre SA, Posca T, Liguori A, Napoli C, Colasanti P, Cali A, Vecchione R. Histological findings and evidence of lipid conjugated dienes and malonyldialdehyde in human fetal aortas. *Acta Paediatr* 1993;82:823-828.
26. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-68.
27. de Groot PG, Ijsseldijk MJ, Sixma JJ. Platelet adhesion to the subendothelium under flow. *Methods Mol Biol* 1999;96:159-170.
28. de Groot PG, Ottenhof-Rovers M, van Mourik JA, Sixma JJ. Evidence that the primary binding site of von Willebrand factor that mediates platelet adhesion on subendothelium is not collagen. *J Clin Invest* 1988;82:65-73.
29. de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990;75:308-312.

30. Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Henrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4584-4587.
31. Dzau VJ, Gibbons GH, Cooke JP, Omoigui N. Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives. *Circulation* 1993;87:705-719.
32. Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* 2002;39:330-339.
33. Emambokus NR, Frampton J. The glycoprotein IIb molecule is expressed on early murine hematopoietic progenitors and regulates their numbers in sites of hematopoiesis. *Immunity* 2003;19:33-45.
34. Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, Takayama H. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med* 1998;188:267-276.
35. Fitzgerald LA, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1987:572-593.
36. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7450-7454.
37. Frith CH, Suber RL, Umholtz R. Hematologic and clinical chemistry findings in control BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab Anim Sci* 1980;30:835-840.
38. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
39. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* 1995;74:224-227.
40. Gawaz M. Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. New York: Thieme; 2001:1-56.
41. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000;148:75-85.
42. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164-1171.
43. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-1539.

44. George JN, Nurden AT. Inherited disorders of the platelet membrane: Glanzmann Thrombasthenie, Bernard-Soulier Syndrome, and other disorders. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994:652-672.
45. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett* 1997;413:255-259.
46. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-1438.
47. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999;155:1-5.
48. Gimbrone MA, Jr., Bevilacqua MP, Cubulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1990;598:77-85.
49. Ginsberg MH, Du X, O'Toole TE, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1995;74:352-359.
50. Goertz DE, Christopher DA, Yu JL, Kerbel RS, Burns PN, Foster FS. High-frequency color flow imaging of the microcirculation. *Ultrasound Med Biol* 2000;26:63-71.
51. Grüner S. Die Rolle der Thrombozyten-und Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Atherogenese: eine In-vivo-Studie an der ApoE-Knock-Out-Maus. Vet.Med.Diss. 2003.
52. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2:275-281.
53. Hartet. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr* 1948;26:577-583.
54. Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, Martin-McNulty B, Vergona R, Sullivan ME, Halks-Miller M, Taffet GE, Michael LH, Entman ML, Wang YX. Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2326-H2334.
55. Hartwell DW, Wagner DD. New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins. *Thromb Haemost* 1999;82:850-857.
56. Hawiger J. Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. *Thromb Haemost* 1995;74:369-372.
57. Heinzeller T, Büsing CM. Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg. Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 2001:132-144.
58. Heller R. Platelets and their factors. Berlin: Springer Verlag; 1997.

59. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594.
60. Hirsch JG. Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. *J Exp Med* 1960;112:15-22.:15-22.
61. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994.
62. Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol* 1985;22:151-163.
63. Ibele GM, Kay NE, Johnson GJ, Jacob HS. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* 1985;65:1252-1255.
64. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4431-4435.
65. Ishigami M, Swertfeger DK, Hui MS, Granholm NA, Hui DY. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1020-1026.
66. Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation* 1994;90:1669-1678.
67. Kaibuchi K, Takai Y, Sawamura M, Hoshijima M, Fujikura T, Nishizuka Y. Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J Biol Chem* 1983;258:6701.
68. Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 1992;176:587-592.
69. Kasirer-Friede A, Ware J, Leng L, Marchese P, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of Integrin alphaIIb beta3. *J Biol Chem* 2002;277:11949-11956.
70. Kinlough-Rathbone RL, Reimers H, Mustard JF. Sodium arachidonate can induce platelet shape change and aggregation which are independent of the release reaction. *Science* 1976;192:1011.
71. Klinger MH, Wilhelm D, Bubel S, Sticherling M, Schroder JM, Kuhnel W. Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:541-546.

72. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2336-2345.
73. Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature* 1999;401:808-811.
74. Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia- reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994;28:289-294.
75. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
76. Liebich HG. Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. Stuttgart, New York: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH; 1993:102-113.
77. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001;154:485-490.
78. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
79. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999;104:1041-1050.
80. Mahley RW, Rall SC, Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-537.
81. Mahley RW, Weisgraber KH, Melchior GW, Innerarity TL, Holcombe KS. Inhibition of receptor-mediated clearance of lysine and arginine-modified lipoproteins from the plasma of rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:225-229.
82. Marcus AJ. Pathways of oxygen utilization by stimulated platelets and leukocytes. *Semin Hematol* 1979;16:188-195.
83. Marcus R, Peritz E, Gabriel KR. On closed testing procedures with special reference to ordered analysis of variance. *Biometrika* 1976;63:655-660.
84. Marguerie GA, Thomas-Maison N, Ginsberg MH, Plow EF. The platelet-fibrinogen interaction. Evidence for proximity of the A alpha chain of fibrinogen to platelet membrane glycoproteins IIb/III. *Eur J Biochem* 1994; 139:5-11.
85. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;196:887-896.
86. Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berlin)* 1998;198:23-35.
87. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998;92:507-515.

88. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999;94:3829-3838.
89. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003;197:41-49.
90. Massberg S, Vogt F, Dickfeld T, Brand K, Page S, Gawaz M. Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res* 2003;110:187-194.
91. May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002;106:2111-2117.
92. McEver RP. Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb Haemost* 1991;66:80-87.
93. McEver RP. Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 1994;714:185-189.
94. McEver RP. Selectins. *Curr Opin Immunol* 1994;6:75-84.
95. McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J* 1997;14:585-591.
96. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:S97-103.
97. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996;135:1633-1642.
98. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 1983;24:1070-1076.
99. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988;58:249-261.
100. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet* 1997;349:1498-1504.
101. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet* 1997;349:1436-1442.
102. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14:133-140.

103. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:842-851.
104. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680-2690.
105. Napoli C, Witztum JL, de Nigris F, Palumbo G, D'Armiento FP, Palinski W. Intracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercholesterolemia-induced fatty streak formation than extracranial arteries. *Circulation* 1999;99:2003-2010.
106. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831-842.
107. Neri D, Montigiani S, Kirkham PM. Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities. *Trends Biotechnol* 1996;14:465-470.
108. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem* 2000;275:23998-24002.
109. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001;20:2120-2130.
110. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985;318:470-472.
111. Nieuwenhuis HK, Sakariassen KS, Houdijk WP, Nievelstein PF, Sixma JJ. Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood* 1986;68:692-695.
112. Okada M, Sagawa T, Tominaga A, Kodama T, Hitsumoto Y. Two mechanisms for platelet-mediated killing of tumour cells: one cyclo-oxygenase dependent and the other nitric oxide dependent. *Immunology* 1996;89:158-164.
113. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:1239-1246.
114. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 1985;57:65-73.
115. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68:231-240.

116. Paigen B, Plump AS, Rubin EM. The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:258-264.
117. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-851.
118. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994;14:605-616.
119. Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol* 1999;19:8326-8334.
120. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-843.
121. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991;65:359-362.
122. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 1992;18:324-332.
123. Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr* 1995;15:495-518.:495-518.
124. Quek LS, Pasquet JM, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, Hibbs ML, Dunn AR, Lowell CA, Watson SP. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood* 2000;96:4246-4253.
125. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994;14:141-147.
126. Reininger AJ, Korndorfer MA, Wurzinger LJ. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by the integrin alphaIIbeta3. *Thromb Haemost* 1998;79:998-1003.
127. Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1993.
128. Romeis B. Mikroskopische Technik. München: 1989.
129. Romo GM, Dong J-F, Schade A, Gardiner EE, Kansas GS, Li C.Q., McIntire LV, Berndt MC, López JA. The glykoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999;190:803-813.
130. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.

131. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 1997;78:611-616.
132. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998;94:657-666.
133. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84:289-297.
134. Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ, Wilson JM. Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. *Hum Gene Ther* 2002;13:155-161.
135. Shattil SJ. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost* 1995;74:149-155.
136. Shattil SJ, Gao J, Kashiwagi H. Not just another pretty face: regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin alpha IIb beta 3. *Thromb Haemost* 1997;78:220-225.
137. Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997;100:91-95.
138. Shattil SJ, Ginsberg MH. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997;100:1-5.
139. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998;91:2645-2657.
140. Shen Y, Romo GM, Dong JF, Schade A, McIntire LV, Kenny D, Whisstock JC, Berndt MC, Lopez JA, Andrews RK. Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) Ibalpha for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex. *Blood*; 95:903-910.
141. Shpilberg O, Rabi I, Schiller K, Walden R, Harats D, Tyrrell KS, Coller B, Seligsohn U. Patients with Glanzmann thrombasthenia lacking platelet glycoprotein alpha(IIb)beta(3) (GPIIb/IIIa) and alpha(v)beta(3) receptors are not protected from atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1044-1048.
142. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom A, Forbes CD, eds. *Haemostasis and thrombosis*. Livingstone: Churchill; 1994:259-285.
143. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.
144. Steinbach JH, Blackshear PL, Jr., Varco RL, Buchwald H. High blood cholesterol reduces in vitro blood oxygen delivery. *J Surg Res* 1974;16:134-139.
145. Talbott GD, Frayser R. Hyperlipidaemia: a cause of decreased oxygen saturation. *Nature* 1963;200:684.:684.
146. Tanahashi N, Fukuuchi Y, Tomita M, Tomita Y, Inoue K, Satoh H, Abe T. Adhesion of adenosine diphosphate-activated platelets to human brain microvascular endothelial cells under flow in vitro is mediated via GPIIb/IIIa. *Neurosci Lett* 2001;301:33-36.

147. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 1995;36:2320-2328.
148. Theilmeier G, Lenaerts T, Remacle C, Collen D, Vermylen J, Hoylaerts MF. Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoid/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood* 1999;94:2725-2734.
149. Theilmeier G, Michiels C, Spaepen E, Vreys I, Collen D, Vermylen J, Hoylaerts MF. Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood* 2002;99:4486-4493.
150. Tomita Y, Tanahashi N, Tomita M, Itoh Y, Yokoyama M, Takeda H, Schiszler I, Fukuuchi Y. Role of platelet glycoprotein IIb/IIIa in ADP-activated platelet adhesion to aortic endothelial cells in vitro: observation with video-enhanced contrast microscopy. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001;24:1-9.
151. Topper JN, Gimbrone MA, Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 1999;5:40-46.
152. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24-27.
153. Tronik-Le Roux D, Roullot V, Poujol C, Kortulewski T, Nurden P, Marguerie G. Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha(IIb) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood* 2000;96:1399-1408.
154. Tunstall-Pedoe H, Vanuzzo D, Hobbs M, Mahonen M, Cepaitis Z, Kuulasmaa K, Keil U. Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 2000;355:688-700.
155. Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 2002;15:439-446.
156. Vogel SN. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med* 1999;107:479-487.
157. Wagner C, Mascelli M, Neblock DS, Weisman H, Coller B, Jordan R. Analysis of GpIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996;88:907-914.
158. Watson SP, McNally J, Shipman LJ, Godfrey PP. The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelets. *Biochem J* 1988;249:345.
159. Weiss HJ, Turitto VT. Prostacyclin inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 1979;53:244-250.
160. White JG. Is the canalicular system the equivalent of the muscle sarcoplasmic reticulum? *Hemostasis* 1975;4:185.

161. White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994:397-413.
162. White JG, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol* 1980;101:353-364.
163. Whitten C, Greilich P. Thrombelastography: past, present and future. *Anaesthesiology* 2000;92:1223-1225.
164. Yamanishi J, Takai Y, Kaibuchi K. Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;112:778.
165. Yan Z, Zhang J, Holt JC, Stewart GJ, Niewiarowski S, Poncz M. Structural requirements of platelet chemokines for neutrophil activation. *Blood* 1994;84:2329-2339.
166. Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* 1994;94:937-945.
167. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258:468-471.
168. Zheng YM, Liu C, Chen H, Locke D, Ryan JC, Kahn ML. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol Chem* 2001;276:12999-13006.

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Gruppeneinteilung in der Übersicht	21
Tabelle 2: Der Versuchsablauf in der Übersicht	23
Tabelle 3: Liste der Inhaltsstoffe des cholesterinreichen Futter	25
Tabelle 4: Uniforme Merkmalsverteilung in der F1-Generation	26
Tabelle 5: Aufspaltung des Genotyps in der F2-Generation im Verhältnis 1:2:1	27
Tabelle 6: Schema des angewendeten Zuchtmodus	27
Tabelle 7: Reaktionsansatz (25µl) für die Amplifizierung des GPIIb -Gens	29
Tabelle 8: Reaktionsansatz (25µl) für die Amplifizierung des ApoE- Gens	29
Tabelle 9: Primer der PCR-Ansätze (GPIIb - Lokus)	30
Tabelle 10: Primer der PCR-Ansätze (ApoE - Lokus)	30
Tabelle 11: Übersicht über die PCR Bedingungen für 35 Zyklen	30
Tabelle 12: Liste der verwendeten Antikörper	34
Tabelle 13: Genotypverteilung	50
Tabelle 14: Phänotypverteilung	53
Tabelle 15: Expression unterschiedlicher thrombozytärer Membranproteine in durchflusszytometrischer Analyse	56
Tabelle 16: Blutungszeiten [min] von GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen	57
Tabelle 17: Einzelwerte der Gerinnungszeit (CT) [sec], Gerinnsel-Bildungszeit (CFT) [sec] und maximaler Gerinnsselfestigkeit (MCF) [mm] bei GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen	59
Tabelle 18: Einzelwerte des Hämoglobingehaltes [g/dl], Hämatokritwertes [%] und der Thrombozytenzahl [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	63
Tabelle 19: Pathologische Befunde bei GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen)	65
Tabelle 20: Histopathologische Befunde bei GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen)	71
Tabelle 21: Einzelwerte der intravitalmikroskopisch ermittelten fest adhärenenten Thrombozytenzahl/mm ² bei GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen	74
Tabelle 22: plasmatische Cholesterinwerte [g/dl] von GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen) nach 8-wöchiger (12 Wochen alte Tiere) und 12-wöchiger (16 Wochen alte Tiere) cholesterinreicher Diät.	75
Tabelle 23: Resistance Index (RI) der Aorta abdominalis bei GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen	77
Tabelle 24: Einzelwerte der mithilfe <i>En-face</i> -Technik ermittelten relativen Plaquefläche [%] der A. carotis bei GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen	79
Tabelle 25: Einzelwerte der mithilfe <i>En-face</i> Technik ermittelten relativen Plaquefläche [%] des Aortenbogens bei GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen	81
Tabelle 26: Histomorphometrisch ermittelte Einzelwerte des durchschnittlichen Wertes relativer Plaqueflächen [%]. Die Auswertung bezieht sich auf GPIIb ^{-/-} ApoE ^{-/-} -Mäusen und ApoE ^{-/-} -Mäusen (=GPIIb ^{+/+} ApoE ^{-/-} -Mäusen) im Alter von 12 und 16 Wochen.	83

11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Thrombozytenaktivierung _____ 4

Abbildung 2: Integrinstruktur _____ 8

Abbildung 3: Gefäßaufbau _____ 11

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation _____ 14

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation _____ 15

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Atherogenese: Stadium der „Fatty streaks“ ____ 15

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Atherogenese: Stadium der stabilen fibrösen
Kappe _____ 16

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Atherogenese: Ruptur der fibrösen Kappe ____ 17

Abbildung 9: Beispiel eines Thrombelastogramms mit Messparameter _____ 36

Abbildung 10: Skizze des Versuchsaufbau bei intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie ____ 39

Abbildung 11: Präparation des Empfängertieres _____ 42

Abbildung 12: Durchführung der duplexsonographischen Untersuchung _____ 46

Abbildung 13: Schematische Darstellung der entnommenen Gefäßabschnitte _____ 47

Abbildung 14: Darstellung der Ermittlung der relativen Plauefläche _____ 48

Abbildung 15: Darstellung der histomorphometrischen Auswertung serieller Schnitte ____ 49

Abbildung 16: Gelelektrophorese _____ 51

Abbildung 17: Immunophänotypisierung im Vollblut _____ 53

Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der Expression des GPIIb-IIIa im PRP ____ 54

Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Expression des P-Selektins, GPVI
und GPIb-V-IX im PRP _____ 55

Abbildung 20: Thrombelastogramm _____ 58

Abbildung 21: Thrombelastographie _____ 58

Abbildung 22: Hämatokrit _____ 60

Abbildung 23: Hämoglobingehalt _____ 61

Abbildung 24: Thrombozytenzahl _____ 62

Abbildung 25: makroskopische Veränderungen _____ 67

Abbildung 26: histopathologische Veränderungen bei GPIIb^{-/-} ApoE^{-/-}-Mäusen _____ 70

Abbildung 27: Thrombozytenadhäsion am Gefäßendothel _____ 73

Abbildung 28: endotheliale Thrombozytenadhäsion _____ 73

Abbildung 29: plasmatische Cholesterinwerte _____ 75

Abbildung 30: Duplexsonographie _____ 76

Abbildung 31: Sudan-III-Färbung der A. carotis _____ 78

Abbildung 32: relative Plauefläche in der A. carotis _____ 79

Abbildung 33: Sudan-III-Färbung des Aortenbogens _____ 80

Abbildung 34: relative Plauefläche des Aortenbogens _____ 80

Abbildung 35: Van Giesson-Färbung des Querschnittes der Bifurkation der A. carotis ____ 82

Abbildung 36: Relatives Plaueausmaß in seriellen Querschnitten der A. carotis _____ 83

Abbildung 37: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation _____ 90

Abbildung 38: Schematische Darstellung der Atherogenese: Initiation _____ 91

Abbildung 39: Schematische Darstellung der Atherogenese: Stadium der „Fatty Streaks“ ____ 91

Abbildung 40: Schematische Darstellung der Atherogenese Stadium der stabilen fibrösen
Kappe _____ 92

Abbildung 41: Schematische Darstellung der Atherogenese: Ruptur der fibrösen Kappe ____ 92

12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.: Arteria (lat.)

Aa.: Arteriae (lat.)

Abb.: Abbildung

Abk.: Abkürzung

ADP.: Adenosindiphosphat

ApoE.: Apolipoprotein E

bzw.: beziehungsweise

°C.: Grad Celsius

DNA: Desoxyribonucleinsäure

F1-Generation: Filialgeneration 1. Grade

F2-Generation: Filialgeneration 2.Grades

Fa.: Firma

FACS: Flourescence activated cell sorting system

g: Gramm

Gp.: Glykoprotein

GFP: green fluorescent protein

kg: Kilogramm

kDa: Kilo Dalton

LDL: Low density lipoprotein

µg: Mikrogramm

µl: Mikroliter

µm: Mikrometer

m: Meter

min: Minuten

ml: Milliliter

mm: Millimeter

MW: Mittelwert

nm: Nanometer

n: Anzahl

PBS: phosphat buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PRP: platelet rich plasma

rpm: rounds per minute

RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

Stabw: Standardabweichung

sin: Sinus

s.u.: siehe unten

Tab.: Tabelle

V: Vena (lat.)

vWF: von Willebrand Faktor

z.B.: zum Beispiel

13 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit und deren Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz für die wegweisenden Ratschläge, seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und fachliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. habil. S. Massberg für die hervorragende Projektbetreuung. Mit Engagement und Fachkunde konnte er mich für das Thema der vaskulären Biologie begeistern und mich mit unermüdlicher Energie zur Verwirklichung des Projektes führen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt bedanke ich mich für die freundliche und intensive Unterstützung und Durchsicht des Manuskriptes.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, Dr. med. vet. Ildiko Konrad, Elisabeth Kennerknecht, Dr. med. vet. Susanne Sauer, Michael Lorenz, Sandra Kerstan und Kirsten Langenbrink für die engagierte tatkräftige Hilfe und äußerst kollegiale Zusammenarbeit.

Besonders danken möchte ich Prof. J. Frampton und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der GPIIb^{-/-}C57Bl/6 J-Mäuse.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Dr. med. Martina Rudelius und Renate Hegenloh, die wesentlich zum Gelingen der pathologischen und histopathologischen Charakterisierung des neuen Tiermodells beigetragen haben.

Ganz herzlich danke ich Dr. med. Martin Eichhorn, Eduard Scherer und Jan Liebscher für die herausragende technische Unterstützung und Hilfe bei der elektronischen Datenverarbeitung.

Besonders danken möchte ich Roswitha Bergmeier, Isabella Kratzer, Maren Bathge, Marlies Glöde und Stephan Wallasch für die äußerst verantwortungsvolle und zuverlässige Tierpflege.

14 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Katrin Schürzinger
Geburtsdatum	19.04.1975
Geburtsort	Passau

Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule St. Anton, Passau
1985 - 1991	Adalbert-Stifter-Gymnasium, Passau
1991 - 1992	Friendswood Highschool, Texas
1992 - 1995	Adalbert-Stifter-Gymnasium, Passau
5/1992	Highschool-Abschluss in den USA
6/1995	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

4/1996 - 9/1996	Romanistik und Afrikanologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
9/1996	Beginn des Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/1999 – 5/2000	Auslandsstudium an der Universität von Sevilla als fachfreie Erasmusstudentin
8/2002	III. Staatsexamen
9/2002	Approbation als Tierärztin
Seit 10/2002	Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München als Stipendiatin des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 438 (Vaskuläre Biologie in der Medizin)