

Aus der III. Medizinischen Klinik für
Kardiologie und Kreislaufkrankungen
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
(Prof. Dr. med. M. Gawaz, Ärztlicher Direktor)

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

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

**Der Einfluss des Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 auf die Adhäsion von
endothelialen Progenitorzellen in zwei Gefäßverletzungsmodellen der Maus**

- Untersuchungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie -

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

von
Alexandra Gauß
aus
Bretten

München, 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Reese

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum.....	2
2.1	Aufbau und Funktion der Blutgefäße	2
2.1.1	Wandaufbau von Arterien, Venen und Kapillaren	2
2.1.2	Funktion des Gefäßendothels	4
2.1.3	Endothelverletzung	5
2.2	Ischämie und Reperfusion	6
2.2.1	Mechanismen während der Ischämie.....	6
2.2.2	Reperfusionsschaden	6
2.2.3	Die Rolle der Thrombozyten während Ischämie und Reperfusion	7
2.3	Die Rolle der Thrombozyten in Hämostase und Atherogenese.....	8
2.3.1	Morphologie der Thrombozyten.....	8
2.3.2	Primäre und sekundäre Hämostase.....	10
2.3.2.1	Primäre Hämostase mit Thrombozytenadhäsion und -aggregation.....	11
2.3.2.2	Sekundäre Hämostase.....	13
2.4	Die Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran.....	13
2.4.1	Integrine	14
2.4.2	Leuzinreiche Glykoproteine	15
2.4.3	Selektine	16
2.4.4	Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp	16
2.4.4.1	Struktur des Glykoproteinrezeptors GPVI.....	17
2.4.4.2	Signalübermittlung und Funktion des GPVI	18
2.4.4.3	Lösliches Glykoprotein VI	19
2.5	Hämatopoetische Stammzellen.....	20
2.5.1	Einteilung der hämatopoetischen Stammzellen.....	20
2.5.2	Adhäsionsmoleküle der hämatopoetischen Stammzellen.....	22
2.5.3	Herkunft und Aufgabe der endothelialen Progenitorzellen	24
2.6	Pathophysiologie der Atherosklerose	24
2.6.1	Definition der Atherosklerose.....	24
2.6.2	Risikofaktoren.....	25
2.6.3	Pathogenese	25
3	Eigene Untersuchungen	28
3.1	Zielsetzung.....	28
3.2	Untersuchungsgut und Methoden	29
3.2.1	Wahl und Durchführung der Narkose.....	29
3.2.2	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	29
3.2.3	Übersicht über den Ablauf der Versuche.....	30
3.2.4	Herstellung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133.....	31
3.2.5	Isolierung und Färbung der verwendeten Zellen	32
3.2.5.1	Isolierung von humanen Endothelzellen	32
3.2.5.2	Isolierung von humanen CD34 ⁺ Zellen	32
3.2.5.3	DCF-Färbung der verwendeten Zellen	33
3.2.6	Vorbereitung der Mäuse für die Intravitalmikroskopie (IVM).....	33
3.2.6.1	Vorbereitung für die Aufnahmen der Arteria carotis	34
3.2.6.2	Vorbereitung für die Aufnahmen des Dünndarmes.....	35

3.2.7	Aufbau des Arbeitsplatzes	36
3.2.8	Methode und Durchführung der Intravitalmikroskopie.....	37
3.2.8.1	Intravitalmikroskopie an der Arteria carotis.....	38
3.2.8.2	Intravitalmikroskopie am Dünndarm.....	39
3.2.9	Dokumentation und Auswertung der IVM-Aufnahmen.....	40
3.2.10	Histologische Untersuchung.....	40
3.2.10.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	41
3.2.10.2	Elastica van Gieson Färbung (EvG-Färbung)	43
3.2.11	Statistische Berechnungen	44
3.3	Ergebnisse.....	45
3.3.1	Allgemeine Darstellung der Versuche.....	45
3.3.2	Intravitalmikroskopische Untersuchungen im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis	46
3.3.2.1	Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen.....	46
3.3.2.2	Vergleich des bispezifischen Adhäsionsmolekül mit der Kontrollgruppe	49
3.3.3	Intravitalmikroskopische Untersuchungen im Ischämie-Reperfusionmodell des Dünndarmes.....	53
3.3.3.1	Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen in den Arteriolen.....	53
3.3.3.2	Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen in den Venolen	55
3.3.3.3	Vergleich des bispezifischen Adhäsionsmoleküls mit der Kontrollgruppe in den Arteriolen.....	58
3.3.3.4	Vergleich des bispezifischen Adhäsionsmoleküls mit der Kontrollgruppe in den Venolen.....	60
4	Diskussion.....	65
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung.....	65
4.1.1	Das Mausmodell	65
4.1.2	Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen.....	65
4.1.3	Einsatz des Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133.....	67
4.1.4	Charakterisierung der Zellinteraktionen mit der Gefäßwand mittels Intravitalmikroskopie.....	68
4.1.5	Schwierigkeiten bei der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.....	69
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	70
4.2.1	Allgemeine Beobachtungen.....	70
4.2.2	Ergebnisse aus dem Carotismodell.....	70
4.2.2.1	Vergleich humaner Endothelzellen mit humanen CD34 ⁺ Progenitorzellen im Carotismodell.....	70
4.2.2.2	Vergleich der Versuche mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 mit der Kontrollgruppe.....	71
4.2.3	Ergebnisse aus dem Darmmodell	71
4.2.3.1	Vergleich humaner Endothelzellen mit humanen CD34 ⁺ Progenitorzellen in Arteriolen und Venolen	71
4.2.3.2	Vergleich der Versuche mit dem Adhäsionsmolekül mit der Kontrollgruppe in den Arteriolen und Venolen des Dünndarmes.....	72
4.2.4	Vergleich der beiden Verletzungsmodelle.....	72
4.2.5	Homing der CD34 ⁺ Progenitorzellen.....	74
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	75

5	Zusammenfassung	76
6	Summary	77
7	Anhang.....	78
8	Literaturverzeichnis	94
9	Tabellenverzeichnis	110
10	Abbildungsverzeichnis	111
11	Abkürzungsverzeichnis	115
12	Danksagung	118

1 EINLEITUNG

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes sind im Jahre 2006 43,7% der Todesfälle in Deutschland auf Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zurückzuführen. Insgesamt stellen die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 9,5% der Sterbefälle und der akute Myokardinfarkt mit 7,3% die beiden häufigsten Todesursachen dar. Als gemeinsame pathophysiologische Ursache des akuten Myokardinfarktes sowie der instabilen Angina pectoris ist die Ruptur der atherosklerotischen Plaque anzusehen (GAWAZ 1999; STRAUER 2001). Die Beseitigung der Arterienokklusion mittels Ballondilatation und Stentimplantation sowie medikamentöser Thrombolyse sind gängige Therapieansätze (STRAUER 2001). Da bei diesen Eingriffen eine Schädigung des Gefäßendothels auftritt und somit die Gefahr einer Restenose besteht, ist es denkbar, hämatopoetische Stammzellen einzusetzen, um den Heilungsprozess zu unterstützen.

Die vorliegende Arbeit soll an zwei verschiedenen Verletzungsmodellen der Maus Aufschluss über die Interaktionen von hämatopoetischen Stammzellen mit dem Gefäßendothel geben. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob durch die Verwendung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 eine vermehrte Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen an geschädigte Gefäßabschnitte erzielt werden könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wird die Adhäsion von hämatopoetischen Stammzellen an Gefäßendothel mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie optisch dargestellt und ausgewertet.

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 **Aufbau und Funktion der Blutgefäße**

2.1.1 **Wandaufbau von Arterien, Venen und Kapillaren**

Das Kreislaufsystem besteht aus Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen, Venen und dem Herzen. Seine Aufgaben umfassen den Gas- und Nährstoffaustausch sowie die Regulation des Thermohaushaltes und den Transport von unterschiedlichen Stoffen, wie Hormonen und Enzymen.

Arterien verzweigen sich mehrfach, wobei ihr Durchmesser kontinuierlich abnimmt. Ihre kleinste Einheit, die Arteriolen, münden nach weiterer Aufzweigung in die eng vernetzten Kapillaren, in welchen der Gas- und Stoffwechselfaustausch mit dem Gewebe stattfindet. Die postkapillären Gefäßabschnitte sammeln sich in den Venolen, und diese gehen unter stetiger Größenzunahme in kleine, mittelgroße und große Venolen über.

Entsprechend den kreislaufdynamischen Anforderungen sind die Gefäßwände unterschiedlich aufgebaut. Die Innenwand einer Kapillare besteht aus einem einschichtigen Endothel. Dem Endothel liegt außen die Basalmembran an, welche vollständig oder unterbrochen sein kann. Außerdem liegen den meisten Kapillaren außen Perizyten an, welche teilweise noch von einer Basalmembran eingeschlossen sind. Es gibt je nach Funktion der Gewebe drei Kapillartypen. Kapillaren mit einem zusammenhängenden Endothel sind der häufigste Typus und kommen in Gehirn, Lunge, Muskulatur und Retina vor. Der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe ist bei Kapillaren dieser Art erschwert. Weiterhin gibt es Kapillaren mit fenestriertem Endothel, bei denen zwischen Endothelzellen Lücken bestehen. Dieser Kapillartyp tritt bevorzugt in Geweben mit erhöhtem und beschleunigtem Flüssigkeitsaustausch auf und kommt beispielsweise im Dünndarm, in der Niere und in endokrinen Organen vor. Bei den sinusoiden Kapillaren, dem dritten Typus, ist der Austausch zwischen Blut und Gewebe erheblich erleichtert, da sie ein diskontinuierliches Endothel aufweisen und zahlreiche intrazelluläre Poren besitzen. Sinusoide Kapillaren finden sich hauptsächlich in der Leber sowie in hämatopoetischen Organen wie Milz und Knochenmark (JUNQUEIRA und CARNEIRO 1996; LIEBICH 1999).

SCHRIFTTUM

Bei den Arterien unterscheidet man je nach Funktion des Gefäßes den elastischen (Aa. elastotypicae) und den muskulären Typ (Aa. myotypicae). Sie besitzen jedoch einen gemeinsamen Grundbauplan, welcher mit drei ineinander gesteckten Röhren vergleichbar ist. Die Intima (Tunica intima) bildet die innerste Schicht und lässt sich in das einschichtige Endothel (Lamina endothelialis) mit unterlagerter Basalmembran, das bindegewebige Subendothel (Stratum subendotheliale) und die Membrana elastica interna unterteilen. Die Media (Tunica media) stellt die mittlere Schicht dar. Sie besteht aus mehreren Lagen glatter Muskulatur mit darin eingelagerten elastischen und kollagenen Fasern in unterschiedlich hohem Gehalt. Am Übergang zur äußeren Schicht liegt die Membrana elastica externa. Die Adventitia (Tunica externa) steht als äußere Schicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung und ist aus einem Netzwerk fibroelastischer Fasern des Kollagen-Typs I aufgebaut. Die Gefäßwände werden von sympathischen Nervenfasern innerviert. Die Ernährung erfolgt in der Adventitia sowie den äußeren Schichten der Media über Vasa vasorum. Die Intima und die inneren Schichten der Media sind hingegen gefäßlos und werden über Diffusion aus dem zirkulierenden Blut ernährt.

Zu den Arterien vom elastischen Typ gehören die Aorta und ihre Hauptäste. Charakteristisch für diese Gefäße ist ein breites Stratum subendotheliale, dessen kollagene Bindegewebsfasern mit den elastischen Fasern der Media in Verbindung stehen. Die elastischen Fasern der Media nehmen mit den glatten Muskelzellen Verbindung auf, wodurch ein elastisch-muskuläres System entsteht. Diese herznahen Gefäße wandeln die pulsatorisch ausgestoßene Blutmenge in eine kontinuierliche Strömung um, was auch als Windkesselfunktion bezeichnet wird. Die Arterien vom muskulären Typ weisen den typischen dreischichtigen Wandaufbau auf und zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an glatten Muskelzellen in der Media aus. Diese Muskelschicht dient dazu, den intravasalen Druck zu erhalten und die Pulswelle im arteriellen Hochdrucksystem zu regulieren (LIEBICH 1999).

Die Venen haben ebenfalls einen dreischichtigen Wandaufbau, jedoch ist die Schichtung weniger deutlich. Das Stratum subendotheliale ist schwach ausgeprägt und an Stelle der Membrana elastica interna ist ein dünnes Netz elastischer Fasern ausgebildet. Die Media besteht überwiegend aus kollagenen und elastischen Fasern, wobei der Anteil glatter Muskelzellen gering ist. Durch die räumliche Anordnung fibro-muskulärer Elemente erhält die Venenwand ihre Fähigkeit zur flexiblen Dehnung. Diese Dehnungsfähigkeit ist das vorherrschende Merkmal der Venenwand (JUNQUEIRA und CARNEIRO 1996;

LIEBICH 1999). Kleine und mittelgroße Venen weisen Venenklappen auf, die sich in das Gefäßlumen vorwölben und den venösen Blutfluss in Richtung Herz lenken. In *Abbildung 1* ist der Aufbau der Gefäßwand von Arterie, Vene und Kapillare dargestellt.

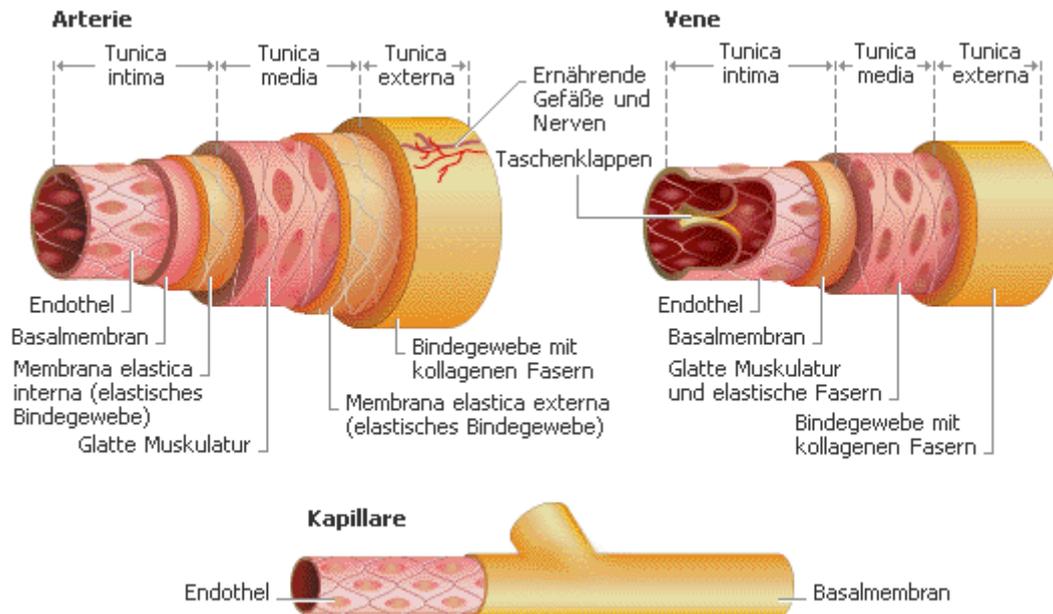


Abbildung 1: Aufbau einer Arterie, einer Vene und einer Kapillare (<http://images.encarta.msn.com/xrefmedia/dencmed/targets/illus/ilt/T978430A.gif>).

2.1.2 Funktion des Gefäßendothels

Das einschichtige Endothel kleidet die Gefäßwand aus und trennt den Blutstrom von den thrombogenen Strukturen des Subendothels (VANE et al. 1990). Zu den Funktionen des Endothels gehört die Regulation des Gefäßtonus, Lipidmetabolismus und Angiogenese. Außerdem sind Endothelzellen an inflammatorischen Prozessen beteiligt, kontrollieren die Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation und beeinflussen die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten (DZAU et al. 1993; GIBBONS und DZAU 1994; CELERMAYER 1997).

Im physiologischen, antithrombotischen Zustand verhindert das Endothel die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten, fördert die Vasodilatation und wirkt Fibrinablagerungen und Thrombinbildung entgegen. Infolge inflammatorischer oder physikalischer Reize nimmt das Endothel einen prothrombotischen Zustand an. Außer einer vermehrten Leukozytenaktivierung und Vasokonstriktion werden Hämostase und

Thrombusbildung erleichtert. Zusätzlich wird die Proliferation glatter Muskelzellen im Bereich der Media gefördert (BECKER et al. 2000).

Das Endothel sezerniert eine Reihe von antithrombogenen Faktoren sowie vasoaktive Substanzen (CELERMAYER 1997; GAWAZ 1999). Vasodilatoren wie Prostazyklin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO) regulieren über eine Relaxation der glatten Muskelzellen den Gefäßtonus (LIAO 1998; GAWAZ 1999). PGI_2 und NO stellen außerdem Hemmstoffe der Thrombozyten dar und wirken einer überschießenden intravasalen Thrombozytenaktivierung entgegen. Aktivierte Thrombozyten hingegen setzen vasokonstriktorische Substanzen wie die Adeninnukleotide Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin und Thromboxan A_2 frei, die in Endothelzellen die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) stimulieren. Ein erhöhter cGMP-Spiegel hat die vermehrte Bildung von NO zur Folge und führt in einem Feedback-Mechanismus zu Vasodilatation und Thrombozyteninhibierung (VANE et al. 1990; LIAO 1998; GAWAZ 1999).

2.1.3 Endothelverletzung

Durch eine Verletzung des Gefäßendothels werden Strukturen der extrazellulären Matrix freigelegt. Diese subendothelialen Strukturen, zu denen Proteoglykane, von-Willebrand-Faktor (vWF), Kollagen und Laminin gehören, induzieren den Prozess der Hämostase (RUGGERI 2002). Die Adhäsion der Thrombozyten an die exponierte Matrix wird als initialer Schritt der Thrombusformation angesehen. Aktiviertes Endothel exprimiert P-Selektin, welches mit dem Glykoprotein PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) der Thrombozyten interagiert und das erste Anheften vermittelt (GAWAZ et al. 2005b). Thrombozyten adhären über den membranären Adhäsionsrezeptor Glykoprotein Ib/IX/V an vWF und über Glykoprotein VI an Kollagen (NIESWANDT et al. 2001a; RUGGERI 2002; MASSBERG et al. 2003a; NIESWANDT und WATSON 2003). Eine feste Adhäsion des Thrombozyten am Endothel wird allerdings erst über die β_3 -Integrine vermittelt (GAWAZ et al. 1997). Auf die Adhäsion der Thrombozyten folgt ihre Aktivierung und im weiteren Verlauf die Thrombozytenaggregation. Auf diese Vorgänge wird in Kapitel 2.3. näher eingegangen.

2.2 Ischämie und Reperfusion

2.2.1 Mechanismen während der Ischämie

Unter Ischämie versteht man eine verminderte arterielle Durchblutung eines Organs oder Gewebes infolge unzureichender (relative Ischämie) oder fehlender (absolute Ischämie) Blutzufuhr (ROESSNER et al. 2001a). Ischämie kann auch als Ungleichgewicht zwischen Sauerstoff- bzw. Substratangebot und -bedarf definiert werden. Wenn die Unterversorgung des Gewebes zu lange anhält, kommt es zu einem Absterben der Zellen durch Apoptose und Nekrose (REIMER und JENNINGS 1992; HEARSE et al. 1993).

Da weder Sauerstoff noch Nährstoffe zu den Zellen gelangen und Stoffwechselprodukte nicht mehr abtransportiert werden, entstehen funktionelle und strukturelle Veränderungen dieser Zellen. Durch die Minderversorgung mit Sauerstoff wird der Stoffwechsel von aerober auf anaerobe Glykolyse umgestellt. Im Rahmen dieser anaeroben Stoffwechsellage kommt es zu einer Anhäufung von Laktat, Protonen und anorganischem Phosphat und somit zu einer Zellazidose (JENNINGS et al. 1981; REIMER und JENNINGS 1992). Es entwickelt sich ein gestörtes Membranpotential, da die zellulären Ionenpumpen nicht mehr in der Lage sind, die Homöostase der Elektrolyte aufrecht zu erhalten. Die intrazelluläre Ansammlung von Kalziumionen hat die Aktivierung endogener Phospholipasen zur Folge, die die Plasmamembran schädigen. Es kommt zu einem Membranödem und im weiteren Verlauf zu einer Zellschwellung (NAYLER und ELZ 1986; FORMAN et al. 1990). Die Phosphatverbindungen ATP, ADP und Kreatininphosphat, die den Zellen als Energiereserven dienen, sind in wenigen Minuten verbraucht (JENNINGS et al. 1981).

Für den Reperfusionsschaden ist auch der Verlust von Schutzmechanismen gegen freie Radikale von Bedeutung. Dazu gehören die Enzyme Superoxiddismutase, die Gluthationperoxidase und die Katalase, sowie endogene Antioxidantien wie Vitamin E, Ascorbinsäure und Cysteine (FERRARI et al. 1985).

2.2.2 Reperfusionsschaden

Im Rahmen der Reperfusion wird der durch einen Gefäßverschluss ischämische Bezirk wieder mit sauerstoffreichem Blut versorgt. Durch die Reperfusion entsteht jedoch eine zusätzliche Schädigung der Zellen, daher auch der Begriff „Reperfusionsschaden“

(NAYLER und ELZ 1986). Diese Bezeichnung beinhaltet die zahlreichen zellulären und biochemischen Mechanismen, die infolge einer vorangegangenen Ischämie stattfinden (NAYLER und ELZ 1986; MAXWELL und LIP 1997). Maxwell und Lip beschreiben die Schwierigkeit, abzugrenzen, ob die durch eine Ischämiephase geschädigten Zellen erst infolge der Reperfusion zugrunde gehen, oder ob die Schädigungen durch die Ischämie bereits so weit fortgeschritten sind, dass sie durch die einsetzende Reperfusion nicht mehr kompensiert werden können (MAXWELL und LIP 1997).

Im Wesentlichen werden für den Reperfusionsschaden zwei Mechanismen verantwortlich gemacht: zum einen ein vermehrter Einstrom von Kalzium in die Zelle und zum anderen die Bildung von Sauerstoffradikalen, die von den Zellen nicht abgebaut werden können (MAXWELL und LIP 1997). Im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsgeschehens im Darm, wie es in den nachfolgenden Versuchen verursacht wird, kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion mit erhöhter Permeabilität, die aus der Mucosaschädigung resultiert, und einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten. Histologisch ist eine Ablösung der Mucosa sowie eine Ulzeration der Villi erkennbar (CHEN et al. 2004).

Aus der erneuten Zufuhr von Sauerstoff und zellulären Komponenten im Rahmen der Reperfusion resultiert eine weitere Verletzung des Endothels in der Mikrozirkulation, die mit einer Verlegung des Kapillarlumens durch neutrophile Granulozyten einhergeht (FORMAN et al. 1990). Dies verursacht eine kontinuierliche Verminderung der Durchblutung in Bereichen potentiell überlebensfähiger Zellen und wird als „no-reflow“ - Phänomen beschrieben (KLONER et al. 1974).

2.2.3 Die Rolle der Thrombozyten während Ischämie und Reperfusion

Auch aktivierte Thrombozyten tragen erheblich zum Reperfusionsschaden bei, indem sie chemotaktisch Reaktionen von Leukozyten und Gefäßendothel vermitteln (GAWAZ et al. 2004). Im Rahmen der Ischämie-Reperfusionsvorgänge werden die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen über den endothelialen P-Selektin Rezeptor vermittelt, wohingegen das thrombozytäre P-Selektin die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten unterstützt (LEFER et al. 1998; MASSBERG et al. 1998; KOGAKI et al. 1999).

Aus den dichten Granula der Thrombozyten wird unter anderem Serotonin freigesetzt, woraufhin Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten in den Entzündungsprozess miteinbezogen werden (GAWAZ et al. 2004).

Thrombozyten tragen, wie in *Abbildung 2* dargestellt, auf vielfältige Weise zum Ischämiegeschehen bei. Ein Thrombus stellt beispielsweise einen mechanischen Verschluss im Bereich einer Plaqueruptur dar. Weiterhin kann der Thrombus nach distal embolisieren. Diese Mikroembolisation führt zu einer verminderten regionalen Blutfluss distal der Stenose und somit zu vorübergehender Ischämie (LANGER und GAWAZ 2006).

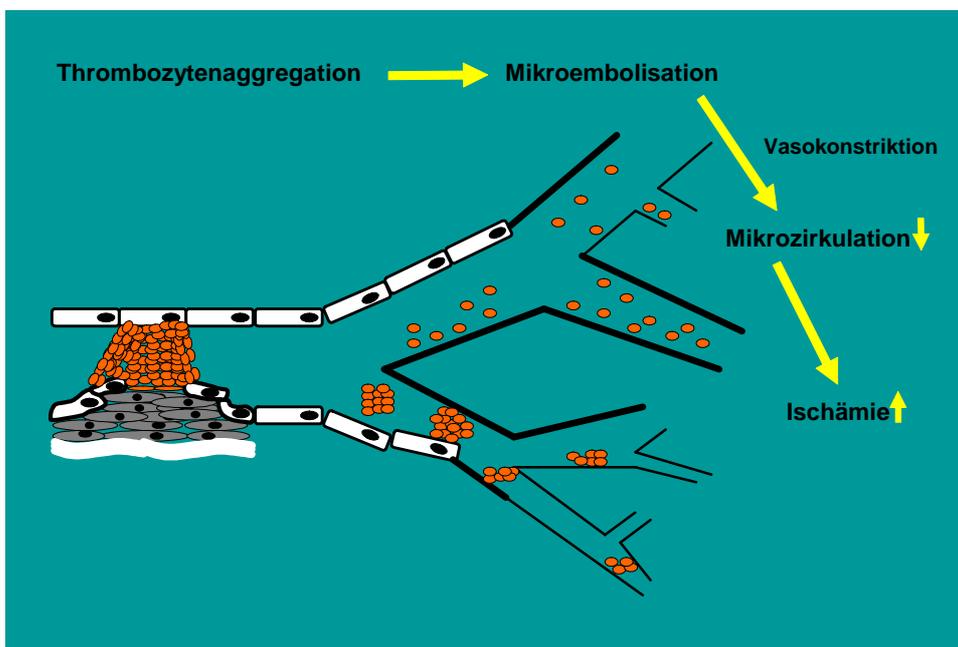


Abbildung 2: Einfluss der Thrombozyten auf die Ischämie (nach LANGER und GAWAZ 2006).

2.3 Die Rolle der Thrombozyten in Hämostase und Atherogenese

2.3.1 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet und stellen die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes dar. Sie weisen keinen Zellkern auf. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt sieben bis zehn Tage. Der Abbau der Thrombozyten erfolgt im retikuloendothelialen System der Leber und Milz (GAWAZ 1999; GEORGE 2000). Thrombozyten weisen im nicht aktivierten Zustand eine diskoide Form auf. Nach Aktivierung durch Adhäsion oder lösliche Agonisten wie ADP oder

Thrombin kommt es zu einer Formveränderung mit Pseudopodienbildung. Die Pseudopodien stellen Ausstülpungen der Plasmamembran dar, wodurch eine vergrößerte Oberfläche entsteht (GAWAZ 1999). *Abbildung 3* zeigt ruhende und aktivierte Thrombozyten in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme.

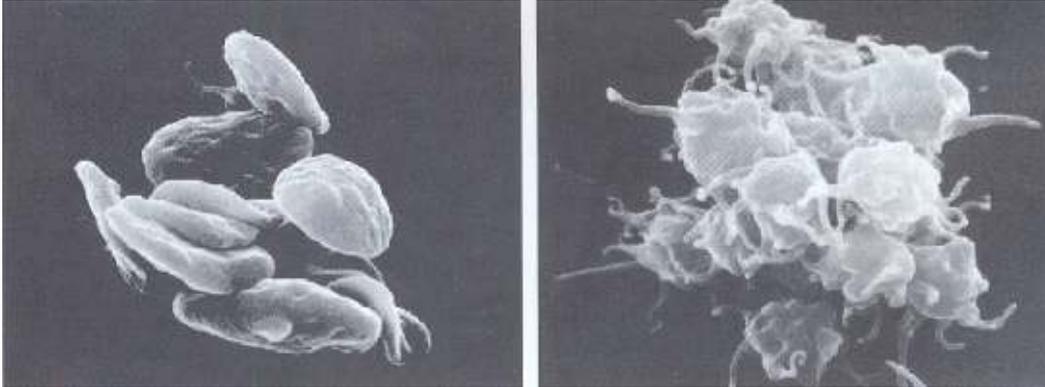


Abbildung 3: Ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten (nach GAWAZ 1999).

Die Ultrastruktur eines Thrombozyten kann in vier morphologische Bereiche unterteilt werden (GAWAZ 1999):

- Periphere Zone
- Strukturelle Zone
- Zone der Organellen
- Membransystem

Die periphere Zone besteht aus einer Zytoplasmamembran und der Glykokalix, die aus verschiedenen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden aufgebaut ist. Die thrombozytäre Plasmamembran weist zahlreiche integrierte Proteine auf, die Rezeptoren für Adhäsionsproteine oder für lösliche Agonisten wie ADP und Thrombin darstellen.

Die strukturelle Zone setzt sich aus Mikrotubuli und anderen Strukturproteinen zusammen, welche die diskoide Form des ruhenden Thrombozyten erhalten, aber auch an der Formveränderung des aktivierten Thrombozyten beteiligt sind. Das Zytoskelett wird von den Strukturproteinen gebildet und besteht hauptsächlich aus Aktin.

Die Zone der Organellen ist im Zytoplasma lokalisiert und besteht aus Mitochondrien, Glykogenspeicher und Speichergranula. Die Granula sind charakteristisch für Thrombozyten, und ihre Inhaltsstoffe spielen eine wichtige Rolle für die Thrombozytenfunktion (GAWAZ et al. 2004). Es gibt drei Untergruppen von Speichergranula:

- Dichte Granula (dense bodies): ADP, ATP, Ca²⁺ und Serotonin
- α -Granula: Enzyme, Wachstumsfaktoren, adhäsive Proteine, Koagulationsfaktoren und zytokinähnliche Proteine
- Lysosomen: hydrolytische Enzyme (wie Elastase und Kollagenase)

Den vierten Bereich der Thrombozytenstruktur stellt das Membransystem dar, welches aus einem offenen kanalikulären und einem dichten tubulären System besteht. Das offene kanalikuläre System ist durch seine bis ins Thrombozyteninnere reichenden Kanäle gekennzeichnet, die mit der Plasmamembran verbunden sind. Das tubuläre System ist einer der Hauptspeicherorte für freie Kalziumionen, die eine wichtige Rolle im Thrombozytenmetabolismus und der Aktivierung spielen. Wird der Schwellenwert der zytoplasmatischen freien Kalziumkonzentration überschritten, tritt die Formveränderung mit Pseudopodienbildung sowie die Degranulation ein (GAWAZ 1999; GEORGE 2000).

2.3.2 Primäre und sekundäre Hämostase

Die Hämostase erfordert ein enges Zusammenspiel zwischen Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatischen Gerinnungsfaktoren (GAWAZ 1999). *Abbildung 4* gibt einen Überblick über die Stadien der Hämostase.

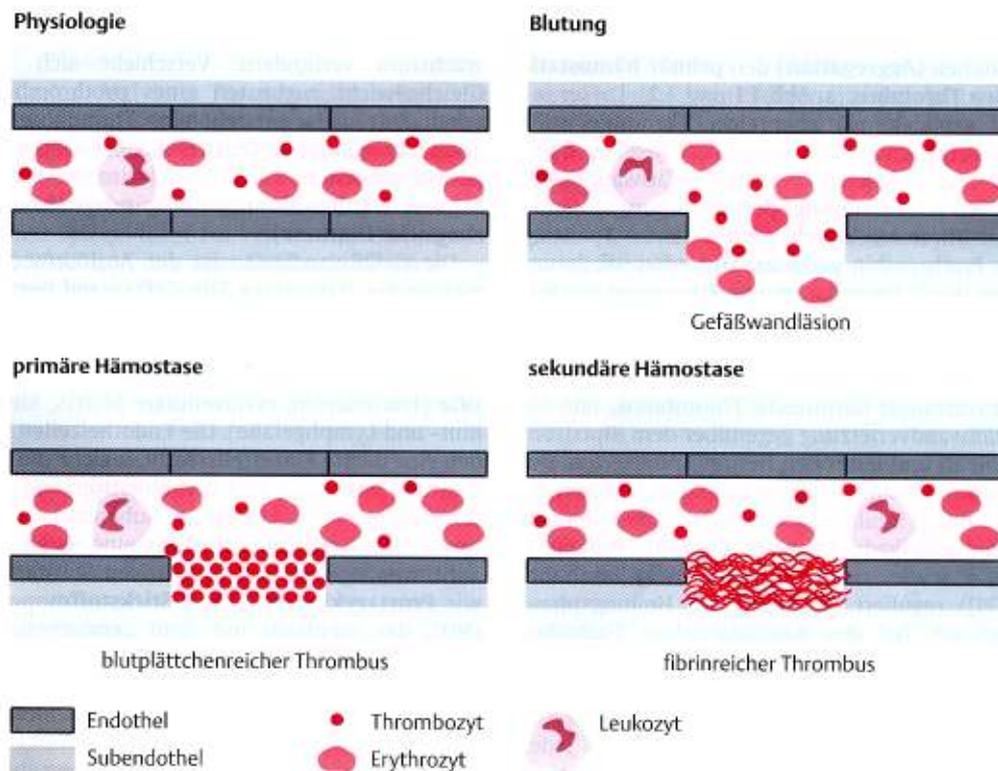


Abbildung 4: Überblick über die Stadien der Hämostase (nach GAWAZ 1999).

- Primäre Hämostase: Gefäßwandverletzung, die von Thrombozyten abgedeckt wird, Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation mit Bildung eines plättchenreichen, primären Thrombus, der noch fragil ist
- Sekundäre Hämostase: Aktivierung der Gerinnungskaskade, Festigung des initial gebildeten Thrombus durch Fibrinbildung
- Fibrinolyse: Hämolytischer Thrombus teils wieder abgebaut, Heilungsphase

2.3.2.1 Primäre Hämostase mit Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Im Rahmen der primären Hämostase kommt es nach Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten zur Bildung eines plättchenreichen Thrombus. Dieser initial gebildete primäre Thrombus dient der Blutstillung, ist jedoch noch relativ instabil. Nach Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt es zur Bildung von Fibrin, welches zur Festigung des Thrombus beiträgt. Es entsteht ein stabiler, fibrinreicher sekundärer Thrombus, der die Gefäßwandverletzung abdichtet und den Heilungsprozess einleitet (GAWAZ 1999).

Nachfolgend wird die Thrombozytenadhäsion und -aggregation näher beschrieben. Der erste Schritt der primären Hämostase wird als primäre Adhäsion bezeichnet und umfasst die Adhäsion von noch ruhenden Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Als sekundäre Adhäsion wird die Anlagerung schon aktivierter Thrombozyten an subendotheliale Strukturen bezeichnet (GAWAZ 1999). Strukturen der extrazellulären Matrix wie Kollagen, elastische Fibrillen und vWF werden durch Gefäßverletzungen freigelegt und dienen als Triggerfaktoren für die Thrombozytenaktivierung (GAWAZ et al. 2005a).

Der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Gefäßwandläsion („tethering“) wird über die Interaktion des thrombozytären Rezeptors Glykoprotein Ib-V-IX mit kollagengebundenem vWF vermittelt (SAVAGE et al. 1996; GAWAZ 1999). Neueren Untersuchungen zufolge spielt auch der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI eine entscheidende Rolle bei der frühen Bindung (MASSBERG et al. 2003a), indem er direkt die Adhäsion an subendotheliales Kollagen und die Aktivierung weiterer Adhäsionsrezeptoren wie GPIIb-IIIa und $\alpha_2\beta_1$ vermittelt. Diese beiden Integrinrezeptoren sind wiederum für die feste Adhäsion von Thrombozyten bedeutend (GAWAZ et al. 1991).

Eine Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion erfolgt über Integrinrezeptoren wie Kollagen-, Laminin- und Fibronectinrezeptor (s. auch Kapitel 2.4.1.) und führt zur weiteren Aktivierung der Thrombozyten. Es kommt zur Formveränderung der adhärenenten Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien, die einen effektiven Verschluss der Gefäßläsion bewirken (GAWAZ 1999; LANGER und GAWAZ 2006). Weitere Agonisten wie Thrombin und ADP sind ebenfalls an der Thrombozytenaktivierung beteiligt (STEINHUBL und MOLITERNO 2005). Außerdem werden während der Adhäsion Inhaltsstoffe aus den Granula der Thrombozyten freigesetzt, die sowohl autokrin den Aktivierungsvorgang verstärken, als auch auf parakrinem Weg Thrombozyten rekrutieren. Zu diesen Mediatoren gehören proinflammatorische und prokoagulatorische Faktoren wie zum Beispiel die Zytokine Interleukin 1β und CD40-Ligand, außerdem Plättchenfaktor 4 und verschiedene Wachstumsfaktoren wie PDGF (GAWAZ 1999; MASSBERG et al. 2002).

Als Aggregation bezeichnet man die Anlagerung von Thrombozyten an bereits adhärenente Thrombozyten (BORN und CROSS 1963) oder den Vorgang der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten (GAWAZ 1999). Mit der Freisetzung von Granulainhaltsstoffen gelangen prokoagulatorische Substanzen in die Umgebung des adhärenenten Thrombozyten,

die weitere Thrombozyten aktivieren. Für die Thrombozytenaggregation sind Scherkraft, Kalzium (Ca^{2+}) und Fibrinogen entscheidend. Sowohl im Plasma als auch in den thrombozytären Granula ist ausreichend Kalzium und Fibrinogen vorhanden (GAWAZ 1999). Eine zentrale Bedeutung bei der Aggregation kommt dem Glykoprotein-IIb-IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche zu (GAWAZ 1999; MASSBERG et al. 2002). Fibrinogen kann in einer kalziumabhängigen Reaktion an den GPIIb-IIIa-Komplex binden und über Fibrinogenbrücken mit anderen Thrombozyten aggregieren (PHILLIPS et al. 1988). Diese Phase ist reversibel und wird als primäre Aggregation bezeichnet. Im weiteren Verlauf kommt es zur Degranulation der Thrombozyten und es erfolgt die irreversible Stabilisierung der Fibrinogenbindung an den GPIIb-IIIa-Komplex (GAWAZ 1999; STEINHUBL und MOLITERNO 2005).

2.3.2.2 Sekundäre Hämostase

Nach der Bildung eines thrombozytenreichen weißen Thrombus in der primären Hämostase, kommt es im Rahmen der sekundären Hämostase zur Stabilisierung des Thrombus. Die Gefäßwandverletzung sowie der Kontakt von Thrombozyten mit dem Subendothel aktivieren die Gerinnungskaskade. Am Ende der Gerinnungskaskade erfolgt aus der Vorstufe Fibrinogen die Bildung von Fibrin, welches zur Festigung des fragilen Thrombozytenaggregates führt (FALK 1991; GAWAZ 1999).

2.4 Die Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran

Um die Interaktionen der Thrombozyten mit dem Endothel, mit der subendothelialen Matrix, mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren, Leukozyten oder Thrombozyten zu vermitteln, sind spezifische Adhäsionsrezeptoren notwendig. Diese membranständigen Glykoproteinrezeptoren werden anhand ihrer Molekülstruktur in vier Gruppen eingeteilt:

- Integrine,
- leuzinreiche Glykoproteine,
- Selektine und
- Rezeptoren vom Immunglobulintyp.

SCHRIFTTUM

Diese vier Gruppen werden im Folgenden näher erläutert (GAWAZ 1999). Die nachfolgende *Tabelle 1* gibt einen Überblick über ausgewählte Rezeptoren.

Klassifizierung	Elektrophoretische Einteilung	CD Nomenklatur	Liganden
Integrine $\alpha_2\beta_1$ $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_v\beta_3$	GPIa-IIa GPIc-IIa GPIIb-IIIa GPav-IIIa	CD49b CD49c CD41-CD61 CD51-CD61	Kollagen Fibronectin Fibrinogen, Fibronectin, vWF, Vitronectin Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin
Leuzinreiche Glykoproteine - -	GPIb-V-IX GPIV	CD42a-b-c CD36	vWF Kollagen, Thrombospondin
Selektine -	P-Selektin	CD62P	PSGL-1
Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp - - -	GPVI ICAM-2 PCAM-1	p62 CD102 CD31	Kollagen LFA-1 ?

Tabelle 1: Ausgewählte Membranglykoproteine auf der Thrombozytenmembran (verändert nach GAWAZ 1999).

2.4.1 Integrine

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die auf nahezu allen Zellen vorkommen. Sie verbinden Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix. Integrine sind neben Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen von Geweben auch an der Thrombozytenadhäsion und –aggregation beteiligt. Sie weisen eine heterodimere Struktur auf, wobei die α -Untereinheit die Spezifität determiniert und die β -Untereinheit der strukturellen Unterscheidung dient (GAWAZ 1999; NEWMAN 2006).

Auf Thrombozyten sind bisher fünf verschiedene Integrinrezeptoren identifiziert, von denen drei der β_1 -Klasse zugeordnet werden: $\alpha_2\beta_1$ (Kollagenrezeptor), $\alpha_5\beta_1$ (Fibronektinrezeptor), $\alpha_6\beta_1$ (Lamininrezeptor) und zwei der β_3 -Klasse angehören: $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fibrinogenrezeptor) und $\alpha_v\beta_3$ (Vitronektinrezeptor) (GAWAZ 1999; NEWMAN 2006).

Der Glykoproteinrezeptor IIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) ist der am häufigsten vorkommende Membranrezeptor der Thrombozyten (PHILLIPS et al. 1988). Er ist spezifisch für Thrombozyten und Megakaryozyten. Seine zentrale Funktion besteht in der Bindung von löslichem Fibrinogen, wobei die Bildung von Fibrinogenbrücken zwischen den Thrombozyten die Voraussetzung für die Aggregation darstellt. Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Konformitätsänderung des GPIIb-IIIa-Komplexes von einem niedrig affinen in einen hoch affinen Funktionszustand, der die Bindung von löslichem Fibrinogen ermöglicht. Daher wird dieser Rezeptor auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet (PHILLIPS et al. 1988; GAWAZ 1999).

Durch die Bindung von Thrombozytenagonisten, wie Thrombin und ADP, an ihre thrombozytären Membranrezeptoren wird über intrazelluläre Signalwege eine Konformitätsänderung der Integrinrezeptoren und somit ihre Aktivierung erreicht. Dieser Prozess wird „inside-out signaling“ genannt. Die Bindung von Liganden an Integrinrezeptoren führt ebenfalls zu einer Konformitätsänderung mit anschließender Aktivierung intrazellulärer Signalvorgänge. Man nennt diesen Mechanismus auch „outside-in signaling“ (PHILLIPS et al. 1988; GAWAZ 1999; MASSBERG et al. 2002).

2.4.2 Leuzinreiche Glykoproteine

Eine weitere Gruppe thrombozytärer Adhäsionsrezeptoren stellen die leuzinreichen Glykoproteine dar, die durch ihren hohen Gehalt an der Aminosäure Leuzin gekennzeichnet sind. Dazu gehören der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex und das Glykoprotein IV (GAWAZ 1999).

Im Rahmen der primären Hämostase spielt der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex, der den Adhäsionsrezeptor für vWF darstellt, eine wichtige Rolle. Über die Interaktion des GPIb-V-IX mit in Kollagenfibrillen immobilisiertem vWF wird der initiale Kontakt der Thrombozyten mit der Gefäßwandläsion hergestellt. Die hoch affine Bindung von vWF mit GPIb-V-IX ermöglicht die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand in Bereichen mit hoher Scherkraft, wie sie im arteriellen Strömungsgebiet auftreten

(SAVAGE et al. 1996; STEINHUBL und MOLITERNO 2005). Diese Bindung ist jedoch instabil und bewirkt das Rollen der Thrombozyten am Endothel. Über diesen intensiveren Kontakt mit dem Kollagen wird die Adhäsion über weitere Kollagenrezeptoren wie Integrin $\alpha_2\beta_1$ und GPVI ermöglicht (JACKSON et al. 2001; RUGGERI 2003).

Der Glykoproteinrezeptor IV bindet an Kollagen Typ V, er spielt jedoch keine große Rolle bei der Thrombozytenaktivierung (MOROI und JUNG 1997; SIXMA et al. 1997).

2.4.3 Selektine

Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die heterotypische Interaktionen von Zellen vermitteln. Ihre Molekülstruktur ist durch eine extrazelluläre Lektindomäne mit einer benachbarten „epidermal growth factor-like“-Domäne gekennzeichnet. P-Selektin kommt auf Thrombozyten sowie auf Endothelzellen vor. Es befindet sich in den α -Granula der Thrombozyten und den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und wird erst bei Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert. Auf aktivierten Endothelzellen kommt außerdem E-Selektin vor, das die Granulozytenadhäsion vermittelt. Leukozyten besitzen das L-Selektin, welches an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beteiligt ist (TEDDER et al. 1995; GAWAZ 1999).

2.4.4 Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp

Zu diesem Rezeptortyp gehören das „platelet-endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) und das „intercellular adhesion molecule-2“ (ICAM-2), deren Bedeutung für die Thrombozytenfunktion noch weitgehend unklar ist und daher hier nicht weiter auf diese eingegangen wird.

Einen weiteren Vertreter der Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp stellt das Glykoprotein VI (GPVI) dar (CLEMETSON et al. 1999; JANDROT-PERRUS et al. 2000). Da dieser Rezeptor in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielt, wird im weiteren Verlauf näher auf dessen Bedeutung eingegangen.

Glykoprotein VI ist ein Thrombozytenoberflächenrezeptor für Kollagen (Typ I, II und III) und spielt eine entscheidende Rolle in der kollageninduzierten Thrombozytenaktivierung und -aggregation (WATSON und GIBBINS 1998; NIESWANDT und WATSON 2003; MOROI und JUNG 2004). Neben Kollagen stellt Fibronectin einen weiteren

Bindungspartner für GPVI dar (BÜLTMANN et al. submitted). Erstmals wurde GPVI 1982 durch Clemetson et al. mittels Gel-Elektrophorese identifiziert (CLEMETSON et al. 1982). Megakaryozyten und Thrombozyten sind die einzigen Zellen, in denen eine signifikante Menge an für GPVI kodierender RNA nachgewiesen wurde (JANDROT-PERRUS et al. 2000).

Eine Studie an einem Patienten mit einer autoimmunbedingten Thrombozytopenie, verursacht durch ein fehlendes 65-kDa-Protein, das bei gesunden Menschen vorhanden ist, lieferte den ersten Hinweis darauf, dass dieses Protein (GPVI) ein wichtiger Kollagenrezeptor ist (SUGIYAMA et al. 1987). Patienten mit GPVI-Mangel weisen eine geringgradig verzögerte Blutungszeit auf, die jedoch nicht als Gerinnungsstörung zu bezeichnen ist (SUGIYAMA et al. 1987; MOROI et al. 1989).

Eine Thrombozytenaktivierung über GPVI kann durch Convulxin, das Gift der tropischen Klapperschlange *Crotalus durissus terrificus*, sowie durch einige weitere Schlangengifte ausgelöst werden, die als spezifische Agonisten für GPVI dienen (JANDROT-PERRUS et al. 1997; POLGAR et al. 1997, ZHENG et al. 2001).

2.4.4.1 Struktur des Glykoproteinrezeptors GPVI

GPVI ist ein thrombozytärer Kollagenrezeptor (NIESWANDT et al. 2001a), dessen Struktur von Clemetson et al. mittels cDNA-Klonierung identifiziert wurde. Sein Molekulargewicht beträgt circa 60 kDa (CLEMETSON et al. 1999; JANDROT-PERRUS et al. 2000).

Des Weiteren weist GPVI eine dimere Struktur auf. Miura et al. konnten zeigen, dass ausschließlich die dimere und nicht die monomere Form des GPVI eine hohe Affinität gegenüber fibrillärem Kollagen aufweist und GPVI somit in dimerer Form auf der Thrombozytenoberfläche vorliegt (MIURA et al. 2002). GPVI ist nicht-kovalent an die Fc-Rezeptor- γ -Kette an der Thrombozytenoberfläche gebunden (GIBBINS et al. 1997; NIESWANDT et al. 2001a). Demnach sind zwei GPVI-Moleküle mit einer FcR γ -Kette verbunden (CLEMETSON et al. 1999).

GPVI bildet über Ionenbindung zwischen der Aminosäure Arginin am GPVI-Molekül und der Aminosäure Aspartat der FcR γ -Kette im Bereich der transmembranären Domäne einen Komplex mit der FcR γ -Kette (CLEMETSON et al. 1999; MIURA et al. 2000). Zahlreiche

Studien belegen, dass die Bindung von GPVI an Kollagen eine Aktivierung von Thrombozyten über Tyrosinphosphorylierung der FcR γ -Kette induziert, was darauf hindeutet, dass GPVI eine Schlüsselrolle in der kollageninduzierten Thrombozytenaktivierung einnimmt (GIBBINS et al. 1997; WATSON et al. 2000; MIURA et al. 2002). In *Abbildung 5* ist der Komplex aus Glykoprotein VI und der FcR γ -Kette graphisch dargestellt.

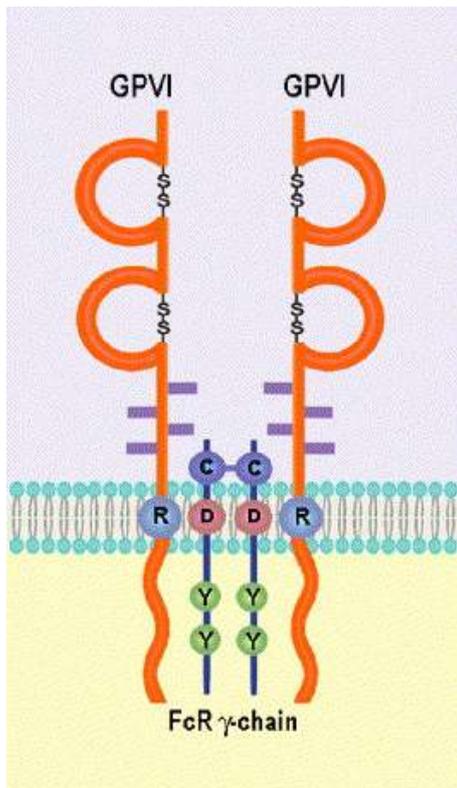


Abbildung 5: Aufbau des Glykoprotein VI-FcR γ -chain-Komplexes (nach MOROI und JUNG 2004).

2.4.4.2 Signalübermittlung und Funktion des GPVI

Bei humanen und murinen Thrombozyten bildet GPVI in der Thrombozytenmembran einen Komplex mit der FcR γ -Kette, der eine wesentliche Funktion in der Signalübermittlung besitzt (GIBBINS et al. 1997; CLEMETSON et al. 1999; NIESWANDT et al. 2000; ZHENG et al. 2001). Der Kollagenrezeptor GPVI induziert die Thrombozytenaktivierung durch einen ähnlichen tyrosinkinase-abhängigen Mechanismus, wie er auch bei Immunrezeptoren auftritt (WATSON und GIBBINS 1998).

Die verschiedenen Kollagene sind wichtige Thrombozytenaktivatoren der Gefäßwand (BAUMGARTNER 1977). Indem GPVI an Kollagen der Gefäßwand bindet, wird die Zusammenlagerung der FcR γ -Kette ausgelöst. Es folgt die Phosphorylierung der ITAM-Domäne (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) am zytoplasmatischen Ende der FcR γ -Kette, wobei verschiedene Tyrosinkinasen wie die Src-Kinase beteiligt sind (GIBBINS et al. 1996). Dieser Prozess führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase Syk. In einem weiteren Schritt wird die Phospholipase C (PLC γ 2) phosphoryliert und aktiviert (GIBBINS et al. 1996; CLEMETSON et al. 1999; PASQUET et al. 1999, NEWMAN 2006). Die aktivierte PLC γ 2 spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Thrombozytenaktivierung, welche letztendlich zur Freisetzung von Granula sowie zur Thrombozytenaggregation führt (WATSON und GIBBINS 1998).

GPVI-defiziente Thrombozyten zeigen eine verminderte kollageninduzierte Adhäsion und Aggregation *in vitro* und *in vivo* (SUGIYAMA et al. 1987; MOROI et al. 1989). Die kollageninduzierte Thrombozytenaktivierung kann bei GPVI-negativen Thrombozyten weder bei Mäusen noch bei Menschen ausgelöst werden (NIESWANDT et al. 2001a; GOTO et al. 2002). Massberg et al. konnten zeigen, dass für die erste Thrombozytenbindung (platelet tethering) die GPVI-Kollagen-Interaktion entscheidend ist und somit die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an geschädigtes Endothel ermöglicht (MASSBERG et al. 2003a). Des Weiteren konnte bei Mäusen in einem Verletzungsmodell der Arteria carotis gezeigt werden, dass durch eine Hemmung oder das Fehlen von GPVI die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel beinahe völlig aufgehoben ist. Diese Vorgänge wurden sowohl mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie als auch elektronenmikroskopisch dargestellt (MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b).

Außerdem vermittelt GPVI die Aktivierung verschiedener Adhäsionsrezeptoren, wie Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ (GIBBINS et al. 1997; NIESWANDT und WATSON 2003).

2.4.4.3 Lösliches Glykoprotein VI

Da die Regulierung der Thrombozytenaktivierung einen entscheidenden Schritt bei der Abgrenzung zwischen physiologischer Hämostase und pathologischer Thrombose darstellt, bieten die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Kollagen wichtige Angriffspunkte für die pharmakologische Intervention (CLEMETSON et al. 1999; CLEMETSON und

CLEMETSON 2001). Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über den Kollagenrezeptor GPVI, seine Struktur und Funktion *in vitro* und *in vivo*, ergeben sich neue Optionen in der Prävention und Therapie der Atherosklerose und ihrer Komplikationen.

Neben dem Einsatz monoklonaler Antikörper gegen GPVI (NIESWANDT et al. 2001b; SCHULTE et al. 2006) besteht eine weitere Möglichkeit der Hemmung von GPVI in der Anwendung von GPVI in einer löslichen dimeren Form. Miura et al. konnten GPVI klonieren und nachweisen, dass lösliches GPVI nur in dimerer Form gebunden an die Immunglobulin-Fc-Domäne eine Affinität zu Kollagen zeigt (MIURA et al. 2002).

Unabhängig davon entwickelten Massberg et al. eine lösliche Form des GPVI, wobei der extrazelluläre Anteil von humanem GPVI kloniert und mit der humanen Immunglobulin-Fc-Domäne verbunden wurde. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte die Adhäsion des löslichen GPVI-Fc an Kollagen nachgewiesen werden (MASSBERG et al. 2003b). Massberg et al. konnten zeigen, dass lösliches GPVI anstelle von Thrombozyten an durch einen Endothelschaden freiliegendes Kollagen bindet. Durch die verhinderte Bindung der Thrombozyten an freiliegendes Kollagen über GPVI unterbleibt die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten (MASSBERG et al. 2003b).

2.5 Hämatopoetische Stammzellen

2.5.1 Einteilung der hämatopoetischen Stammzellen

Stammzellen stellen die Grundform jeglicher Zellen dar und sind verantwortlich für die Entwicklung sämtlicher Gewebe und Organsysteme des Körpers. Die Hämatopoese findet beim adulten Organismus im Mikromilieu des Knochenmarks statt, in welchem eine kleine Population pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen vorkommt und hier zu Selbsterneuerung und Proliferation oder Differenzierung in lymphatische oder myeloische Progenitorzellen programmiert wird. Die lymphatischen und myeloischen Progenitorzellen differenzieren sich weiter in eine der neun hämatopoetischen Zelllinien. *Abbildung 6* veranschaulicht diese Differenzierungsvorgänge. Pro Tag entstehen mehr als eine Billion Blutzellen, die somit das gesamte Blutsystem ein Leben lang erhalten (WEISSMAN 2000; CHAN und WATT 2001).

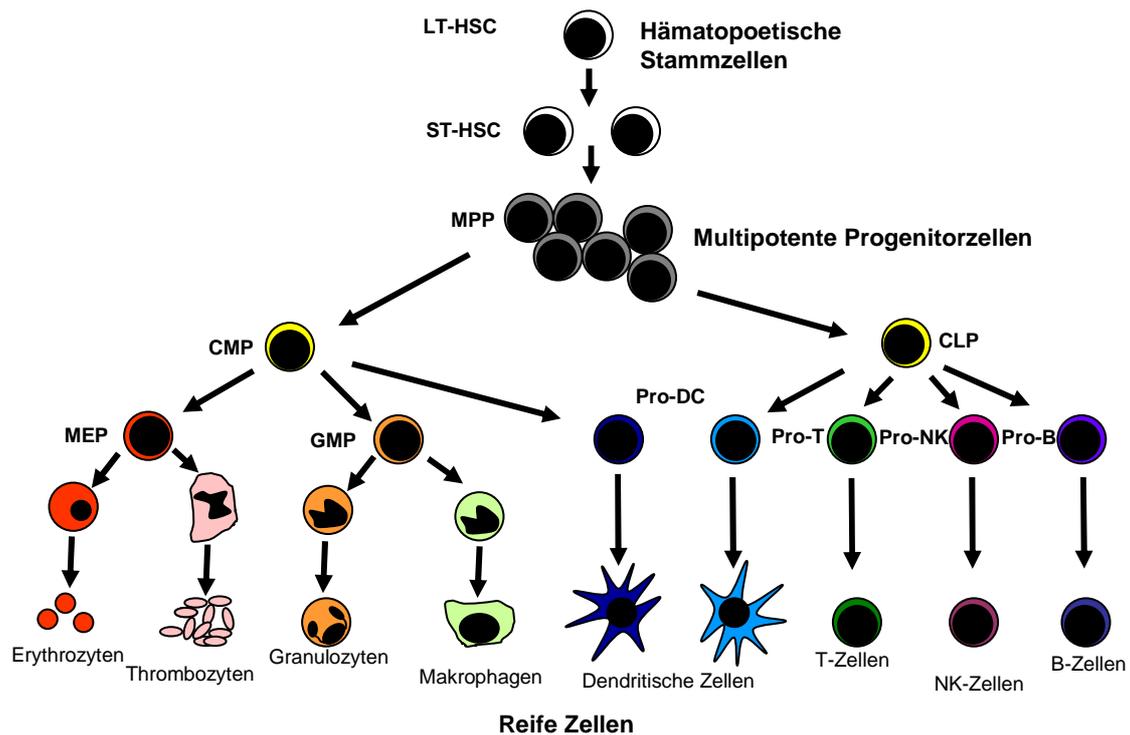


Abbildung 6: Hämatopoetische Stammzellen und Progenitorzelllinien

Hämatopoetische Stammzellen (hematopoietic stem cells, HSC) lassen sich unterteilen in LT-HSC (long term), die sich selbst erneuern und die Hämatopoese ein Leben lang aufrecht erhalten, und in ST-HSC (short term), die sich nur über eine begrenzte Zeitspanne erneuern können. ST-HSC differenzieren sich in multipotente Progenitorzellen, die letztendlich in einem irreversiblen Differenzierungsschritt zu ausgereiften Zellen werden. Aus lymphatischen Progenitorzellen (common lymphoid progenitors, CLP) gehen T- und B-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen hervor. Myeloische Progenitorzellen (common myeloid progenitors, CMP) differenzieren sich in Myelomonocyten Progenitorzellen (GMP) mit Monozyten, Makrophagen und Granulozyten und in Megakaryozyten/Erythroide Progenitorzellen (MEP), aus denen Thrombozyten und Erythrozyten entstehen. Eine Differenzierung in dendritische Zellen kann sowohl aus CLPs, als auch aus CMPs erfolgen. Mit Hilfe von Zelloberflächenmarkern können diese Stamm- und Progenitorzellpopulationen als reine Populationen determiniert werden (verändert nach PASSEGUÉ et al.).

Des Weiteren wird eine Differenzierung von $CD34^+$ Progenitorzellen in endotheliale Progenitorzellen in mehreren Arbeiten beschrieben, wobei dieser Prozess durch die Anwesenheit von Thrombozyten begünstigt wird (YEH et al. 2003; DAUB et al. 2006; LANGER et al. 2006; STELLOS et al. 2008).

Hämatopoetische Stammzellen befinden sich beim adulten Organismus überwiegend im Knochenmark, während lediglich eine kleine Population im peripheren Blut zirkuliert (DAR et al. 2006). Verschiedene Ereignisse wie Entzündungen, Verletzungen oder Stress führen zu einer Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark zum Zielort,

wo sie proliferieren und sich differenzieren (LAPIDOT und PETIT 2002). Eine Mobilisierung von Stammzellen kann auch medikamentös herbeigeführt werden. Häufig wird das Zytokin G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) eingesetzt, um die Freisetzung von Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu bewirken (TO et al. 1997).

2.5.2 Adhäsionsmoleküle der hämatopoetischen Stammzellen

Hämatopoetische Progenitorzellen exprimieren eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen, über die sie Kontakt mit benachbarten Zellen aufnehmen. Zu diesen Adhäsionsmolekülen zählen zum Beispiel die Immunglobulin Superfamilie, Integrine, Selektine und Sialomucine (SIMMONS et al. 1997).

Sialomucine sind glykosylierte Proteine, zu denen unter anderem auch CD34 und CD162 (PSGL-1) gehören (SIMMONS et al. 1997, LEVESQUE und SIMMONS 1999). CD34 (cluster of differentiation 34) wird als Marker für die frühe hämatopoetische Stammzellentwicklung angesehen (WEISSMAN 2000). CD162 interagiert mit P-Selektin der Thrombozyten und ist für den Prozess des Rollens verantwortlich (ZANNETINO et al. 1995; LEVESQUE und SIMMONS 1999).

Einen weiteren bedeutenden Stammzellmarker stellt das 5-Transmembran-Glykoprotein CD133 (cluster of differentiation 133) dar (YIN et al. 1997; MILLER-KASPRZAK und JAGODZINSKI 2007). Sowohl CD34 als auch CD133 werden auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert, wobei sich die beiden Populationen zum großen Teil überschneiden (YIN et al. 1997; LANG et al. 2004; HICKS et al. 2007; WU et al. 2007). Die Expression dieser beiden Oberflächenmarker verliert sich jedoch mit zunehmender Reife und Differenzierung. Daher ist bei Zellpopulationen, die sowohl CD34⁺ als auch CD133⁺ sind, gewährleistet, dass es sich um unreife Populationen hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen handelt (PEICHEV et al. 2000). *Tabelle 2* gibt einen Überblick über die verschiedenen Oberflächenmarker auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen.

SCHRIFTTUM

Zelltyp	Herkunft	Oberflächenmarker
Hämatopoetische Stammzellen (HSCs)	Knochenmark	CD133 ⁺ , CD34 ⁺
Hämatopoetische Progenitorzellen (HPCs)	Knochenmark	Linien-spezifische Marker, CD133 ⁻
Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)	Knochenmark, Gefäßparenchym, Nabelschnurblut, organspezifische EPCs	CD133 ⁺ , CD34 ⁺
Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (CEPs)	Peripheres Blut	CD133 ⁺ , CD34 ⁺

Tabelle 2: Überblick über charakteristische Merkmale von EPCs, CEPs, HSCs und HPCs (verändert nach RAFII und LYDEN 2003)

Eine weitere Familie der Adhäsionsmoleküle stellen die Selektine dar. P-Selektin (platelet, CD62P) kommt auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen vor. Auf aktivierten Endothelzellen wird neben P-Selektin auch E-Selektin (endothelial, CD62E) exprimiert. Auf Leukozyten und auch auf hämatopoetischen Stammzellen kommt L-Selektin (leucocyte, CD62L) vor (GONZALEZ-AMARO und SÁNCHEZ-MADRID 1999; SÁNCHEZ-MADRID und DEL POZO 1999).

Die Integrine spielen ebenfalls eine wesentliche Rolle als Adhäsionsmoleküle der hämatopoetischen Stammzellen. Sie setzen sich aus zwei nicht kovalent assoziierten α und β heterodimeren Untereinheiten zusammen (GONZALEZ-AMARO und SÁNCHEZ-MADRID 1999). CD34⁺ hämatopoetische Progenitorzellen exprimieren beispielsweise das Integrin $\alpha_4\beta_1$ (Very Late Antigen/ VLA-4) und das Integrin $\alpha_5\beta_1$ (VLA-5), welche an Fibronectin binden. $\alpha_4\beta_1$ geht außerdem eine Bindung mit VCAM-1 (CD106) ein, das auf Stromazellen/Endothelzellen vorkommt und der Immunglobulin Superfamilie angehört (LEVESQUE et al. 1995; LEVESQUE und SIMMONS 1999).

Des Weiteren sind Selektine und Integrine am Adhäsionsprozess der CD34⁺ Progenitorzellen an immobilisierte Thrombozyten beteiligt. Während aktivierte Thrombozyten über P-Selektin mit PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) der CD34⁺ Progenitorzellen interagieren und den Prozess des Rollens vermitteln, sind die β_1 - und β_2 -Integrine für die feste Adhäsion der Progenitorzellen verantwortlich (CHAVAKIS et al. 2005; DAUB et al. 2006; LANGER et al. 2006; HRISTOV et al. 2007).

2.5.3 Herkunft und Aufgabe der endothelialen Progenitorzellen

Endotheliale Progenitorzellen stellen eine zirkulierende, vom Knochenmark stammende, Zellpopulation dar. Sie wandern infolge verschiedener Stimuli, wie beispielsweise eines ischämischen Geschehens oder der Stimulation durch Zytokine, aus dem Knochenmark zum verletzten Gewebe und tragen dort zur Neovaskularisierung und Angiogenese bei (ASAHARA et al. 1997; TAKAHASHI et al. 1999; GILL et al. 2001; KAMIHATA et al. 2001). Eine wesentliche Aufgabe der endothelialen Progenitorzellen besteht in der Reparatur des Gefäßendothels nach Endothelverletzungen (HRISTOV et al. 2003; RAFII und LYDEN 2003; URBICH und DIMMELER 2005b; XU 2006).

Neueren Untersuchungen zufolge besitzen Patienten mit einem erhöhten Risiko für koronare arterielle Erkrankungen eine geringere Anzahl an zirkulierenden EPCs, die zudem eine verringerte Aktivität aufweisen. Die Abnahme der zirkulierenden EPCs führt nicht nur zu einer verschlechterten Angiogenese, sondern auch zu einem Fortschreiten der Atherosklerose (VASA et al. 2001; HILL et al. 2003; RAUSCHER et al. 2003; URBICH und DIMMELER 2005b).

2.6 Pathophysiologie der Atherosklerose

2.6.1 Definition der Atherosklerose

Die Welt-Gesundheits-Organisation definiert den Begriff Atherosklerose „als eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (ROESSNER 2004).

In der westlichen Welt stellen kardiovaskuläre Erkrankungen, in erster Linie die koronare Herzerkrankung, die häufigste Todesursache dar. Die Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung bezieht sich im Wesentlichen auf die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Plaques (MURRAY und LOPEZ 1997a; MURRAY und LOPEZ 1997b). Ein Modell der Atherogenese ist in *Abbildung 7* dargestellt.

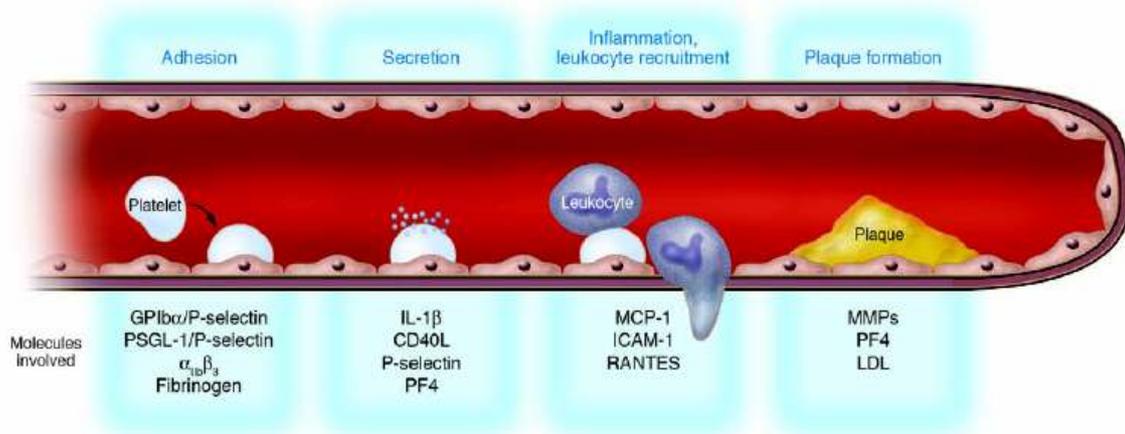


Abbildung 7: Modell der Atherogenese (nach GAWAZ et al. 2005b).

2.6.2 Risikofaktoren

Die Faktoren, die die Atherosklerose begünstigen, sind zum großen Teil bekannt und werden je nach Bedeutung für die Progression der Atherosklerose in Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung eingeteilt (ROESSNER et al. 2001b). Zu den Risikofaktoren erster Ordnung zählen Hyperlipidämie, Hypertonie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus. Neben diesen Faktoren werden allgemeine Adipositas, Hyperurikämie, hormonelle Faktoren, Stress und Bewegungsmangel zu den Risikofaktoren zweiter Ordnung gerechnet. Eine familiäre Belastung spielt ebenfalls eine Rolle (FUSTER et al. 1998; LUSIS 2000; ROESSNER et al. 2001b).

2.6.3 Pathogenese

Pathophysiologisch kann die Atherosklerose als komplexer inflammatorischer Prozess betrachtet werden (ROSS 1999; ZERNECKE und WEBER 2005), welcher ein Zusammenspiel zwischen Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, glatten Muskelzellen und Thrombozyten sowie verschiedenen Mediatoren erfordert. Die einzelnen Mechanismen sind jedoch noch nicht im Detail geklärt.

Atherosklerotische Veränderungen findet man vor allem in Bereichen von Arterienaufzweigungen, in denen turbulente Strömungen vorherrschen und einen mechanischen Reiz auf die Gefäßwand ausüben (GIMBRONE 1999; TOPPER und GIMBRONE 1999).

Die Entstehung einer atherosklerotischen Plaque kann in mehrere Stufen eingeteilt werden. Am Anfang des Prozesses steht eine endotheliale Dysfunktion. Die gesteigerte Permeabilität des Endothels für Lipoproteine führt zu einer vermehrten Ablagerung von cholesterinreichen Lipoproteinen in der Intima (ROSS 1999). Monozyten adhären am Endothel, transmigrieren in die Intima und werden zu Makrophagen. Diese nehmen mit Hilfe von „scavenger-Rezeptoren“ modifizierte Lipoproteine auf und werden zu Schaumzellen. Die Schaumzellen lagern sich in der Intima ab und bilden die „fatty streaks“. Die Bildung der „fatty streaks“ stellt das erste Stadium der Atherosklerose dar und gilt als reversibel (ROESSNER et al. 2001b).

Durch die Vermehrung der Schaumzellen wächst die atherosklerotische Plaque, wodurch das Endothel zusätzlich geschädigt wird. Diese Schädigung begünstigt wiederum die Adhäsion von Thrombozyten, die den platelet derived growth factor (PDGF) sezernieren. PDGF und von Makrophagen und Endothelzellen gebildete Wachstumsfaktoren fördern die Proliferation glatter Muskelzellen (ROESSNER et al. 2001b). Die glatten Muskelzellen synthetisieren verschiedene Kollagene, Proteoglykane und elastische Fasern, wodurch die atherosklerotische Plaque weiter wächst und es zu einer Fibrosierung der Plaque kommt.

Das zweite Stadium ist durch die Entstehung einer fibrösen Kappe gekennzeichnet, die ein nekrotisches Zentrum umgibt. Nach massiver Aufnahme oxidierter lipidreicher Partikel sterben die Schaumzellen nach einiger Zeit ab und bilden einen lipidreichen nekrotischen Kern. Dieses nekrotische Zentrum aus Zelldetritus, Lipiden und Cholesterinkristallen wird von einer fibrösen Schicht begrenzt, die von proliferierenden Muskelzellen gebildet wird (LUSIS 2000). Solange die atherosklerotische Plaque von einer fibrösen Kappe bedeckt ist, und dadurch das thrombogene Material vom Blutstrom abgekapselt ist, spricht man von einer stabilen Plaque (FALK 1991; LIBBY 1998).

Das dritte Stadium ist erreicht, wenn die fibröse Kappe an Stabilität verliert und zu rupturieren droht. In diesem Stadium wird die Plaque als instabil oder vulnerabel bezeichnet (ROSS 1999; LUSIS 2000). Die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur wird von mehreren Faktoren beeinflusst, die zu einer erhöhten Vulnerabilität und Instabilität der Plaque beitragen (FUSTER et al. 1998; MAJESKY 2002). Die fibröse Kappe wird dünner, wenn das Gleichgewicht zwischen Degradation und Neubildung der extrazellulären Matrix gestört ist (LUSIS 2000). Bei der Plaqueruptur wird subendotheliale Matrix freigelegt, wodurch es zu einer Thrombozytenadhäsion und -aggregation im betroffenen Bereich kommt (LIBBY 2002). Die Folgen können arterieller Gefäßverschluss und Ischämie des

nachgeschalteten Gewebes sein. Bei dem thrombotischen Gefäßverschluss als Komplikation der fortgeschrittenen Atherosklerose spielen daher Thrombozyten eine wichtige Rolle (ROSS 1999). *Abbildung 8* zeigt die Atherogenese im zeitlichen Verlauf.

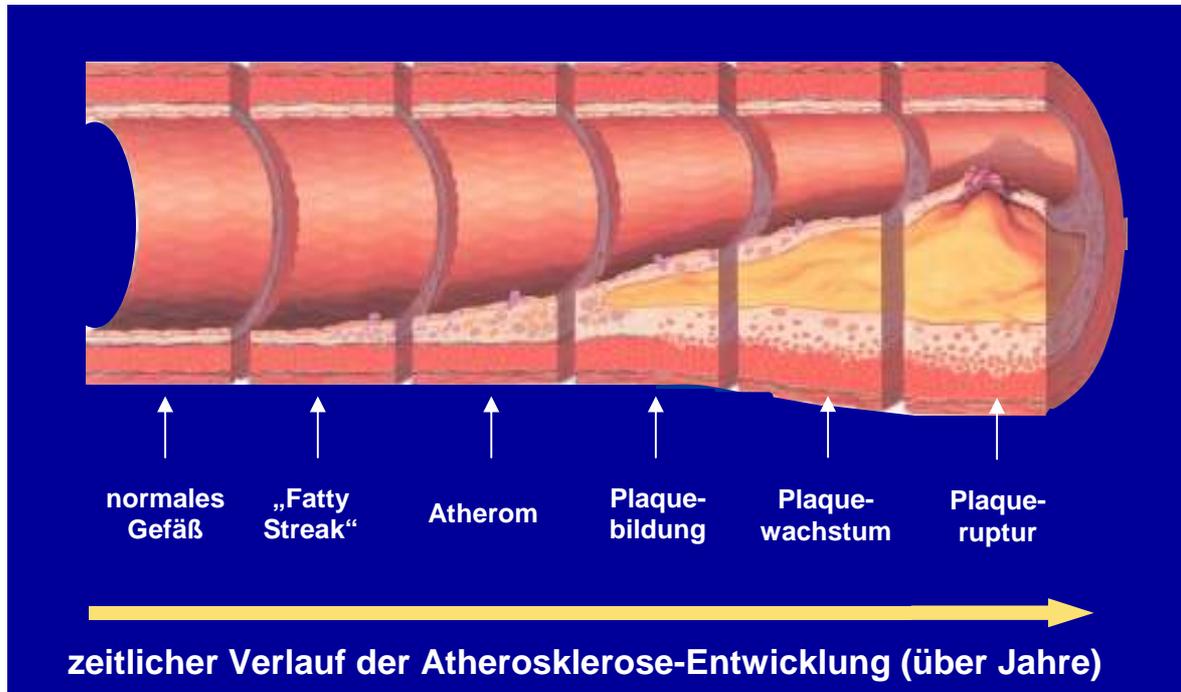


Abbildung 8: Die Atherogenese im zeitlichen Verlauf (nach GAWAZ)

Bei bestehender Atherosklerose mit deutlicher Lumenobstruktion werden Ballondilatation und Stentimplantation zur Aufdehnung des entsprechenden Gefäßabschnittes als Therapiemethoden eingesetzt (LUSIS 2000). Das Auftreten von Komplikationen, wie eine Restenose aufgrund einer Neointimabildung oder eine Thrombosierung, ist jedoch möglich (WERNER et al. 2003; CHOI et al. 2004). Dem wird mit antithrombotischen Medikamenten entgegen gewirkt (FUSTER et al. 1998; LIBBY 1998).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung

Endothelschädigungen haben durch die freiliegende subendotheliale Matrix eine Aktivierung der Gerinnungskaskade mit anschließender Thrombusbildung zur Folge, welche zu einem Gefäßverschluss führen kann. Der geschädigte Gefäßabschnitt weist solange einen thrombogenen Charakter auf, bis er erneut endothelialisiert ist. Solche Endothelverletzungen können nach Plaqueruptur im Rahmen atherosklerotischer Prozesse, nach Ballondilatation oder nach Stentimplantation auftreten. Daher ist es wichtig, dass eine schnelle Endothelialisierung eintritt, die beispielsweise mit Hilfe von Stammzellen erreicht werden könnte.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rekrutierung von hämatopoetischen CD34⁺ Progenitorzellen an Endothelverletzungen in zwei verschiedenen Mausmodellen. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie werden die Interaktionen der Progenitorzellen mit der Gefäßwand optisch dargestellt. Ein ligaturinduziertes Verletzungsmodell der Arteria carotis communis steht einem Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm von C57BL/6J Mäusen gegenüber. In der durchgeführten Studie wird der Nutzen eines rekombinanten Adhäsionsmoleküls untersucht, das sich aus dem löslichen thrombozytären Kollagenrezeptor Glykoprotein VI und einem Antikörper gegen den Stammzellmarker CD133 zusammensetzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu klären, ob durch den Einsatz des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 ein verbessertes Homing von CD34⁺ Progenitorzellen an Endothelverletzungen erreicht werden kann.

3.2 Untersuchungsgut und Methoden

3.2.1 Wahl und Durchführung der Narkose

Die Tiere sind während der gesamten Zeit der Eingriffe sowie während der intravitalmikroskopischen Aufnahmen bis zur Tötung in Narkose. Es wird eine Kombinationsanästhesie aus 0,5 mg/kg KGW Medetomidin (Domitor[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe), 5,0 mg/kg KGW Midazolam (Midazolam-ratiopharm 5 mg/1ml[®], ratiopharm GmbH, Ulm) und 0,05 mg/kg KGW Fentanyl (Fentanyl 0,5 mg curamed[®], CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) intraperitoneal appliziert (HENKE und ERHARDT 2004).

Diese Injektionsnarkose sichert die chirurgische Toleranz und wird durch die Inhalation von Isofluran (Isoba[®], ESSEX Pharma GmbH, München) und Sauerstoff (Linde AG, Pullach) über eine Nasenmaske während der gesamten Eingriffszeit aufrecht erhalten. In regelmäßigen Abständen werden die Puls- und Atemfrequenz sowie der Atemtypus und das Fehlen der Flexorreflexe überprüft. Eine Wärmematte sorgt für die Homothermie des Tieres während der Narkose.

3.2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere werden männliche Wildtypmäuse (C57BL/6J) verwendet, die auf Bestellung im Alter von vier bis fünf Wochen von Charles River Laboratories (Charles River Deutschland GmbH, D-97633 Sulzfeld) geliefert werden. Im Alter von sechs bis acht Wochen werden sie für die Versuche herangezogen. Die Mäuse werden in Gruppen bis zu fünf Tieren in Käfigen vom Makrolon-Typ II long gehalten. Als Einstreu dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat aus Espenholz (Fa. ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich), welches einmal wöchentlich gewechselt wird. Die Tiere erhalten außerdem ein Stück sterilisierten Zellstoff als Nestbaumaterial (Nestlets, Fa. Indulab AG, Gams, Schweiz). Die Einstreu und das Nistmaterial dienen auch der Beschäftigung der Tiere. Die Raumtemperatur in der Tierhaltung beträgt 21°C bei konstanter Entlüftung und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 60%. Frisches Futter (Fa. Provimi Kliba, Kaiseraugst, Schweiz) und Wasser steht den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Für einen geregelten Hell-Dunkel-Rhythmus sorgt eine Beleuchtungsanlage, wobei in der Helligkeitsphase 50 Lux im Käfig erreicht werden.

Das vorliegende Versuchsvorhaben wurde am 27.09.2005 vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß § 8 Tierschutzgesetz (Neufassung vom 25.08.1998) unter der Versuchsnummer M3/05 genehmigt.

3.2.3 Übersicht über den Ablauf der Versuche

Die Interaktion von fluoreszenzmarkierten Zellen mit dem Gefäßendothel wird anhand von zwei unterschiedlichen Verletzungsmodellen untersucht. Das erste Modell ist ein ligaturinduziertes Verletzungsmodell der Arteria carotis und steht für die Makrozirkulation. Die Verletzung wird durch eine fünf Minuten andauernde Ligatur der Arteria carotis dextra bzw. sinistra erreicht. Für die Mikrozirkulation wird hingegen ein Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm der Maus verwendet. Die Ischämiephase beträgt eine Stunde und wird durch Verhinderung der Blutzufuhr in diesem Bereich erreicht. Nach Ablauf dieser Stunde werden die Ligaturen gelöst und die Reperfusion setzt ein. Intravitalmikroskopische Aufnahmen werden sowohl vor als auch nach der Verletzung durchgeführt und im Anschluss ausgewertet.

Im Folgenden werden die einzelnen Versuchsgruppen kurz erläutert, wobei jeweils dieselben Versuche sowohl im Carotismodell als auch im Darmmodell durchgeführt werden. Die verwendeten Zellen werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF (5 (and -6)-carboxyfluorescein diacetate, Fa. Molecular Probes, USA) gefärbt und über einen in der Vena jugularis liegenden Katheter intravenös verabreicht, wobei pro Maus 50.000 Zellen injiziert werden. Die erste Versuchsgruppe wird mit humanen Endothelzellen durchgeführt, bei der zweiten Versuchsgruppe werden CD34⁺ Progenitorzellen eingesetzt. Diese ersten beiden Versuchsgruppen dienen als Vorversuche. In der dritten Versuchsgruppe werden CD34⁺ Progenitorzellen, die mit dem bispezifischen Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 (10µg/ml) 30 Minuten vorinkubiert wurden, appliziert. Die vierte Versuchsgruppe stellt die Kontrolle zur dritten Versuchsgruppe dar. Dabei werden CD34⁺ Progenitorzellen mit den beiden Einzelkomponenten des Adhäsionsmoleküls, GPVI-Fc und dem Antikörper gegen CD133 (jeweils 10µg/ml), vorinkubiert und verabreicht.

3.2.4 Herstellung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133

Dieses Adhäsionsmolekül setzt sich aus dem löslichen GPVI-Fc und einem Antikörper gegen den auf hämatopoetischen Stammzellen auftretenden Marker CD133 zusammen. Die Entwicklung der löslichen Form des GPVI ist bereits bei Massberg et al. beschrieben, wobei der extrazelluläre Anteil von humanem GPVI kloniert und mit der humanen Immunglobulin-Fc-Domäne verbunden wird. Das Protein wird durch Hela Zellen produziert und aus dem Überstand gewonnen (MASSBERG et al. 2003b). Der monoklonale Antikörper W6B3C1 gegen CD133 wurde von Bühring et al. entwickelt und aus Überständen von Hybridomzellen gewonnen (BÜHRING et al. 2002). Die Herstellung des Konstruktes GPVI-aCD133 erfolgt über eine Konjugation dieser beiden Proteine (JUNG et al. 1986). Eine schematische Darstellung dieses Adhäsionsmoleküls ist in *Abbildung 9* dargestellt und zeigt die Bindung einerseits an die Progenitorzellen und andererseits an freiliegende extrazelluläre Strukturen wie Kollagen.

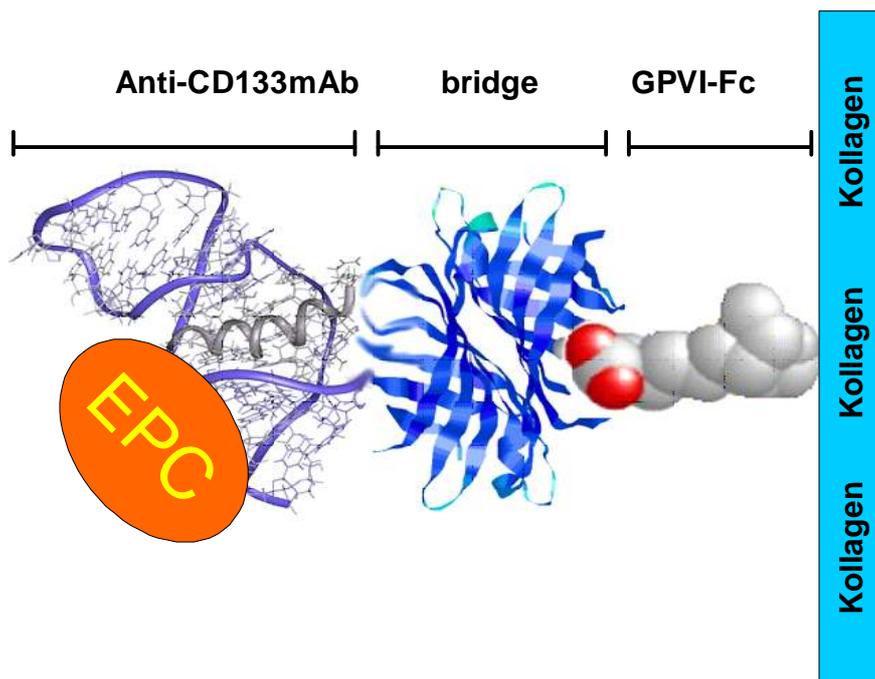


Abbildung 9: Bispezifisches Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 (nach LANGER, unveröffentlicht).

3.2.5 Isolierung und Färbung der verwendeten Zellen

3.2.5.1 Isolierung von humanen Endothelzellen

Humane arterielle Endothelzellen wurden aus Arterien (A. iliaca) von Patienten mit Leber- oder Nierentransplantation wie nachfolgend beschrieben isoliert (AXEL et al. 1996), in niederen Passagen eingefroren und vor Versuchsbeginn wieder aufgetaut. Das Gefäß wird in eine sterile Präparationsschale gelegt und festgesteckt. Nach der Entfernung von Geweberesten wird das Gefäß der Länge nach aufgeschnitten und aufgeklappt. Um ein Austrocknen des Gefäßes zu verhindern, wird es mit DMEM Medium (Fa. invitrogen, Karlsruhe) benetzt. Nun rollt man mit einem Wattestäbchen vorsichtig über die Gefäßinnenwand und streicht das Material in eine mit Endothelzellmedium (Endothelial Cell Growth Medium MV2[®], PromoCell Academy, Heidelberg) gefüllte Petrischale aus. Nachdem eine Konfluenz nach sieben bis zehn Tagen erreicht ist, werden die Endothelzellen subkultiviert und auf typische Endothelzeleigenschaften überprüft.

3.2.5.2 Isolierung von humanen CD34⁺ Zellen

Es besteht die Möglichkeit, hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut (DAUB et al. 2006), Knochenmark oder aus dem peripheren Blut zu isolieren. Auf medikamentösem Wege, wie beispielsweise mit dem Zytokin G-CSF, kann die Produktion von Stammzellen angeregt werden, so dass vermehrt Stammzellen im peripheren Blut auftreten.

Mit Hilfe der MACS-Technik (magnetic affinity cell sorting) können Zellen separiert werden, wobei das CliniMACS[®] System als Standardverfahren gilt. Dabei werden Antikörper, die mit Magnetpartikeln gekoppelt sind, gegen den Stammzellmarker CD34 eingesetzt. Diese Antikörper binden spezifisch an das CD34-Antigen. Auf diese Weise gelingt eine Trennung der CD34⁺ Zellen von den übrigen Zellen in einem Magnetfeld. Durch mehrere hintereinander geschaltete Isolierungs- und Waschschrte wird eine sehr hohe Reinheit der CD34⁺ Zellen erreicht. Die Zellen werden bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Das Auftauen, die Bestimmung der Zellzahl sowie die Färbung der Zellen finden am jeweiligen Versuchstag statt.

3.2.5.3 DCF-Färbung der verwendeten Zellen

Die Zellen, die in der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden, werden mit dem Farbstoff DCF (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, Fa. Molecular Probes, USA) gefärbt. Die adhären Zellen werden abtrypsinisiert (2-3 ml Trypsin) und mit PBS (Phosphat Buffered Saline) gewaschen. Die Zellsuspension wird bei 270 x g für sieben Minuten zentrifugiert. Im Anschluss erfolgt die Zellzahlbestimmung. Die Zellsuspension wird erneut abzentrifugiert (bei 270 x g, 7 Minuten) und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nun folgen die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes DCF (170 µl, in einer Konzentration von 2,5 mg/ml) und eine Inkubationszeit von 10 Minuten in einem abgedunkelten Raum. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS erfolgt eine erneute Zentrifugation bei denselben Werten. Das Pellet wird in PBS resuspendiert und die Zellsuspension ist bereit für die intravenöse Gabe. Pro Maus werden bei den durchgeführten Versuchen 50.000 Zellen verwendet, die in 250 µl gelöst sind. Diese Färbung wird bei den in den Versuchen eingesetzten humanen Endothelzellen sowie den CD34⁺ Zellen angewendet.

3.2.6 Vorbereitung der Mäuse für die Intravitalemikroskopie (IVM)

Das anästhesierte Tier wird in Rückenlage auf einer Wärmematte mit Hilfe von Klebebandstreifen fixiert. Durch die Verwendung einer Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Fa. Bayer, Leverkusen) werden die Augen vor Austrocknung geschützt. Die Präparation des Tieres erfolgt unter einem Stereomikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen). Eine Kaltlichtquelle (Fa. Zeiss, Göttingen) sorgt für die optimale Ausleuchtung des Operationsfeldes.

Der ventrale Halsbereich des Tieres wird enthaart, gesäubert und mit Alkohol desinfiziert. Nun führt man einen 1 cm langen medianen Hautschnitt vom Kinnwinkel beginnend nach caudal aus. Nach der stumpfen Trennung der Speicheldrüsen werden diese seitlich aus dem Eingriffsfeld herausgelagert. Kleinere Gefäße werden mittels Elektrokauter verschlossen, größere Gefäße werden ligiert. Die Vena jugularis sinistra wird freipräpariert. Ein Faden (Prolene[®], 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) wird um dieses Gefäß vorgelegt, um den Katheter (Polythene Tubing, 0,28 mm ID, 0,61 mmOD, Ref. 800/110/100, Fa. Portex) später fixieren zu können. Nun wird eine kleine Inzision der Jugularvene vorgenommen und der Katheter in das Gefäß eingeführt. Mit Hilfe des vorgelegten Fadens ist es möglich, den

Katheter sogleich zu fixieren. Die korrekte Lage des Venenkatheters wird durch eine Spülung mit isotoner Natriumchloridlösung (Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) überprüft. *Abbildung 10* zeigt die korrekte Lage des Venenkatheters.

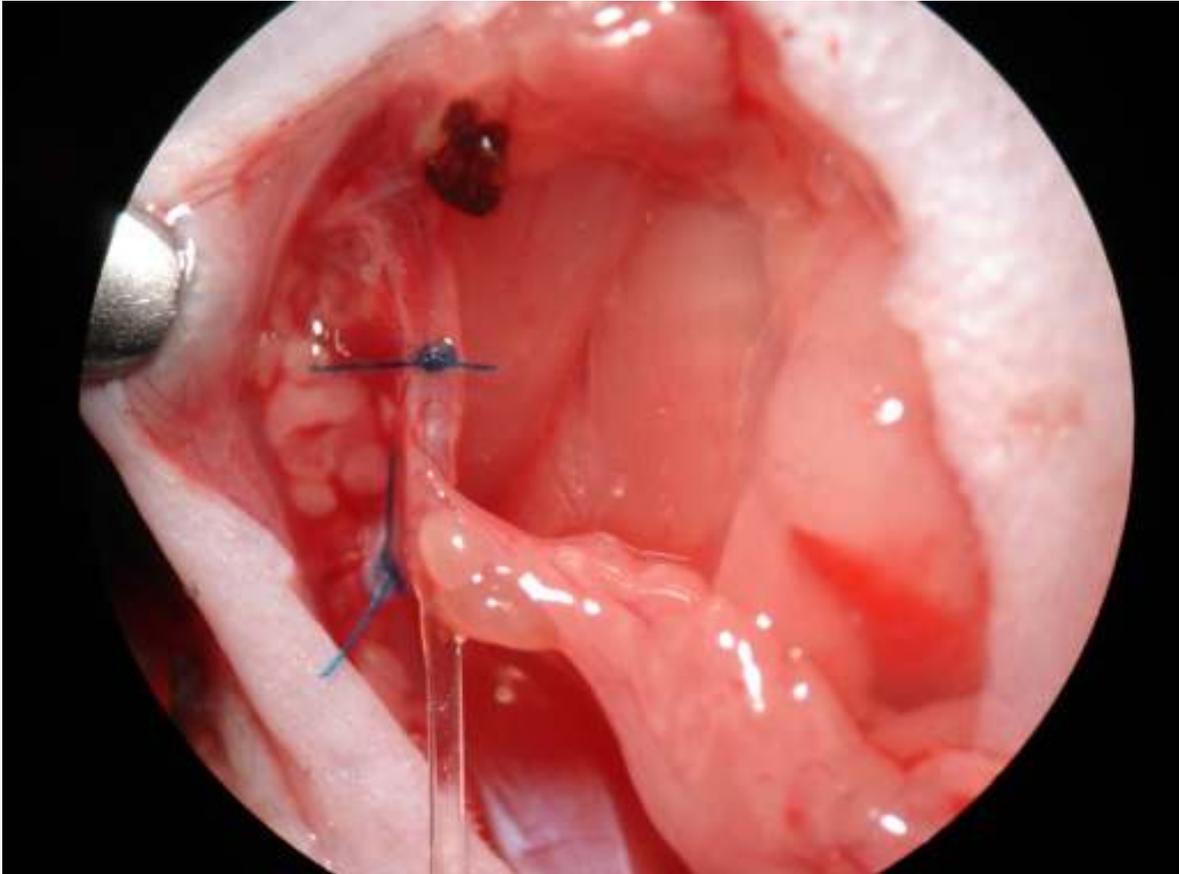


Abbildung 10: Lage des Venenkatheters

3.2.6.1 Vorbereitung für die Aufnahmen der Arteria carotis

Sobald der Venenkatheter in der richtigen Position liegt, wird die Arteria carotis communis vorsichtig freipräpariert. Um bei den Aufnahmen einen besseren Kontrast zu erzielen, wird ein schwarzes, flexibles Stück Plastikfolie unter die Arterie gelegt. Die Gefäße werden ständig mit Natriumchloridlösung befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Um Versuchstiere einzusparen, werden jeweils beide Carotiden einer Maus einer ligaturinduzierten Verletzung unterzogen. Nachdem die Maus unter das Mikroskop (Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200, Fa. Zeiss, Göttingen) gelegt wurde, werden über den Venenkatheter 50.000 DCF - markierte Zellen in 250 μ l gelöst, appliziert. *Abbildung 11* zeigt die für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen freipräparierten Carotiden.

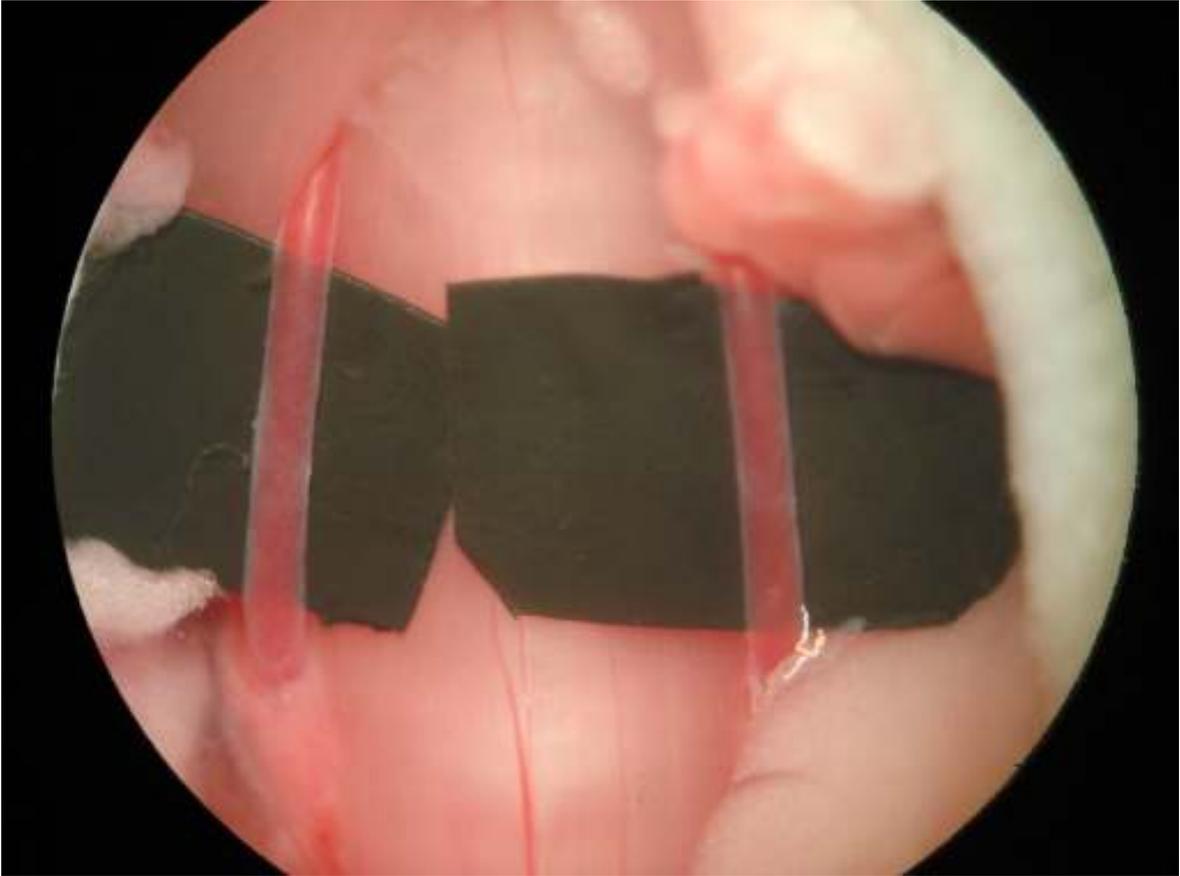


Abbildung 11.: Freipräparierte Carotiden einer Maus

3.2.6.2 Vorbereitung für die Aufnahmen des Dünndarmes

Die Bauchhöhle wird in der Linea alba eröffnet. Um eine bessere Übersicht zu erhalten, ist es hilfreich, die Blase manuell zu entleeren. Danach wird der Dünndarm (Jejunum) auf Parafilm (VWR International GmbH, Bruchsal) ausgelagert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wird das Darmsegment mit körperwarmer Ringerinjektionslösung befeuchtet. Ein Darmsegment wird nun auf ein selbstgebautes Styropor-Knet-Modell gelagert und mit einem Objektträger bedeckt. Die Rinne, in der der Darm liegt, wird ebenfalls befeuchtet. Die Maus wird nun unter das Mikroskop gelegt und über den Venenkatheter werden die DCF - markierten Zellen appliziert. In *Abbildung 12* ist das für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen ausgelagerte Jejunum dargestellt.

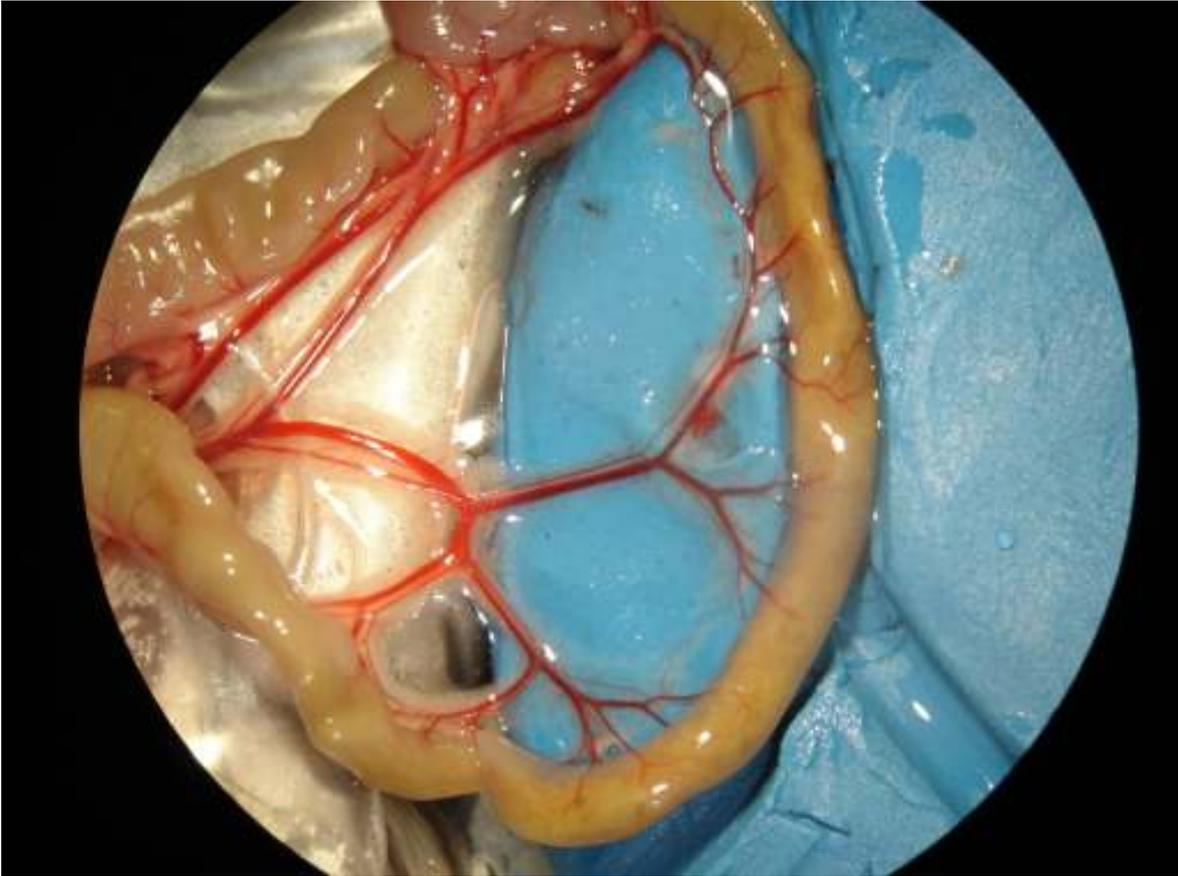


Abbildung 12: Ausgelagertes Darmsegment einer Maus

3.2.7 Aufbau des Arbeitsplatzes

Der Arbeitsplatz kann in drei Untereinheiten eingeteilt werden. Die erste Einheit umfasst das Versuchstier, das auf einer Wärmematte liegt, sowie dessen Versorgung mit Sauerstoff und Narkosegas über eine Nasenmaske. Mit der zweiten Einheit erfolgt die optische Erfassung. Hierzu zählen das Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Fa. Zeiss, Göttingen), die Quelle für das Anregungslicht (HBO 100, Fa. Zeiss, Göttingen) und eine CCD-Kamera (Charged Coupled Device-Kamera, FK 6990-IQ-S, Fa. Pieper GmbH, Schwerte). Die Visualisierung und Aufzeichnung der Daten für die spätere Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Monitors mit angeschlossenem CD-Rekorder und bildet die dritte Einheit. In *Abbildung 13* ist der Aufbau des Arbeitsplatzes dargestellt.

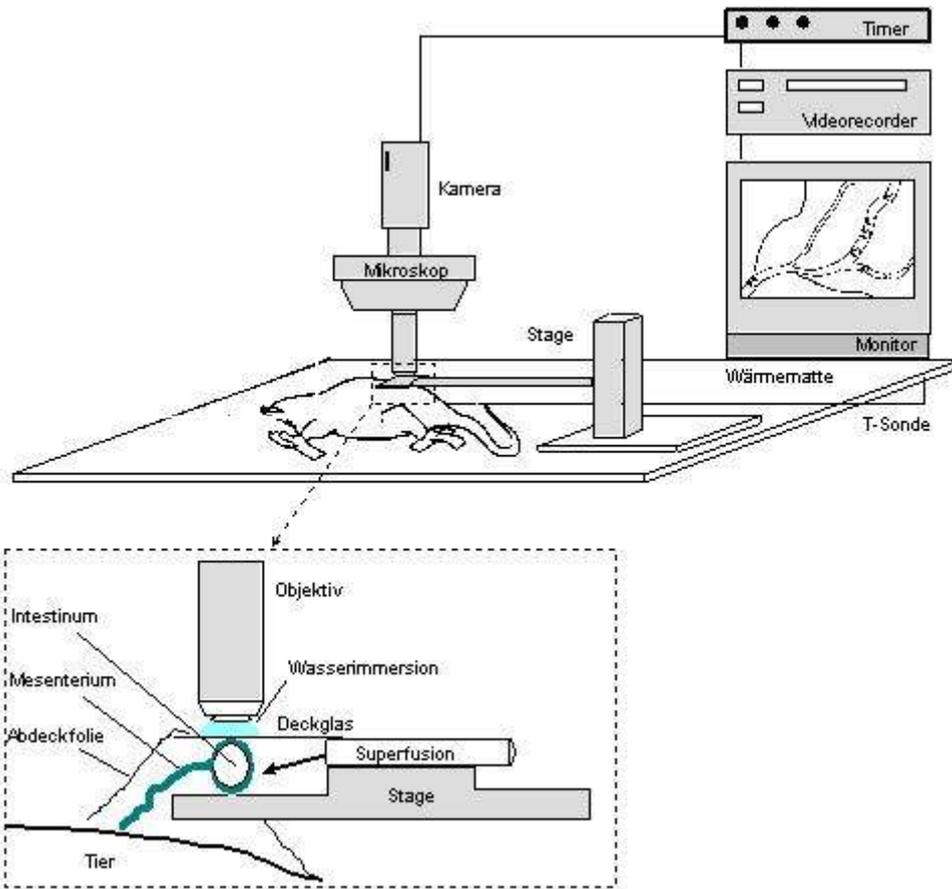


Abbildung 13: Aufbau des Arbeitsplatzes (modifiziert nach http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/lehmann-christian-2001-07-17/HTML/lehmann_html_11290526.gif).

3.2.8 Methode und Durchführung der Intravitalmikroskopie

Mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie gelingt es, Zellen, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, *in vivo* zu untersuchen. Diese Technik basiert darauf, dass Fluorophore kurzwelliges Anregungslicht absorbieren und als langwelliges Licht wieder emittieren. In der vorliegenden Arbeit werden humane Endothelzellen und CD34⁺ Progenitorzellen verwendet, die jeweils mit dem Farbstoff DCF gefärbt sind. Durch den Einsatz spezieller Filter kann das Fluoreszenzmikroskop auf bestimmte Spektralbereiche (Anregung: 495 nm, Emission: 517 nm) eingestellt werden. Durch die Verwendung eines 20x Objektivs mit Wasserimmersion wird ein ausreichender Kontakt mit dem Gewebe gesichert.

3.2.8.1 Intravitalmikroskopie an der Arteria carotis

Zu Beginn erfolgt eine Übersichtsaufnahme der jeweiligen Arteria carotis communis mit einem 10x Objektiv. Diese Aufzeichnung dient später dazu, den Gefäßdurchmesser zu bestimmen. Im Anschluss folgen Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung von jeweils 30 Sekunden Dauer. Es werden vier Aufnahmen pro Zeitfenster aufgenommen. In der vorliegenden Arbeit werden die Aufnahmezeitpunkte folgendermaßen gewählt: vor ligaturinduzierter Verletzung sowie 5, 10, 30 und 60 Minuten nach Lösen der Ligatur. Die Endothelschädigung wird durch eine fünfminütige Ligatur erzielt.

Auf dem Monitor können die aktuell durchgeführten Aufnahmen betrachtet werden, die auf CD aufgezeichnet werden. *Abbildung 14* zeigt die A. carotis communis während der Ligatur.

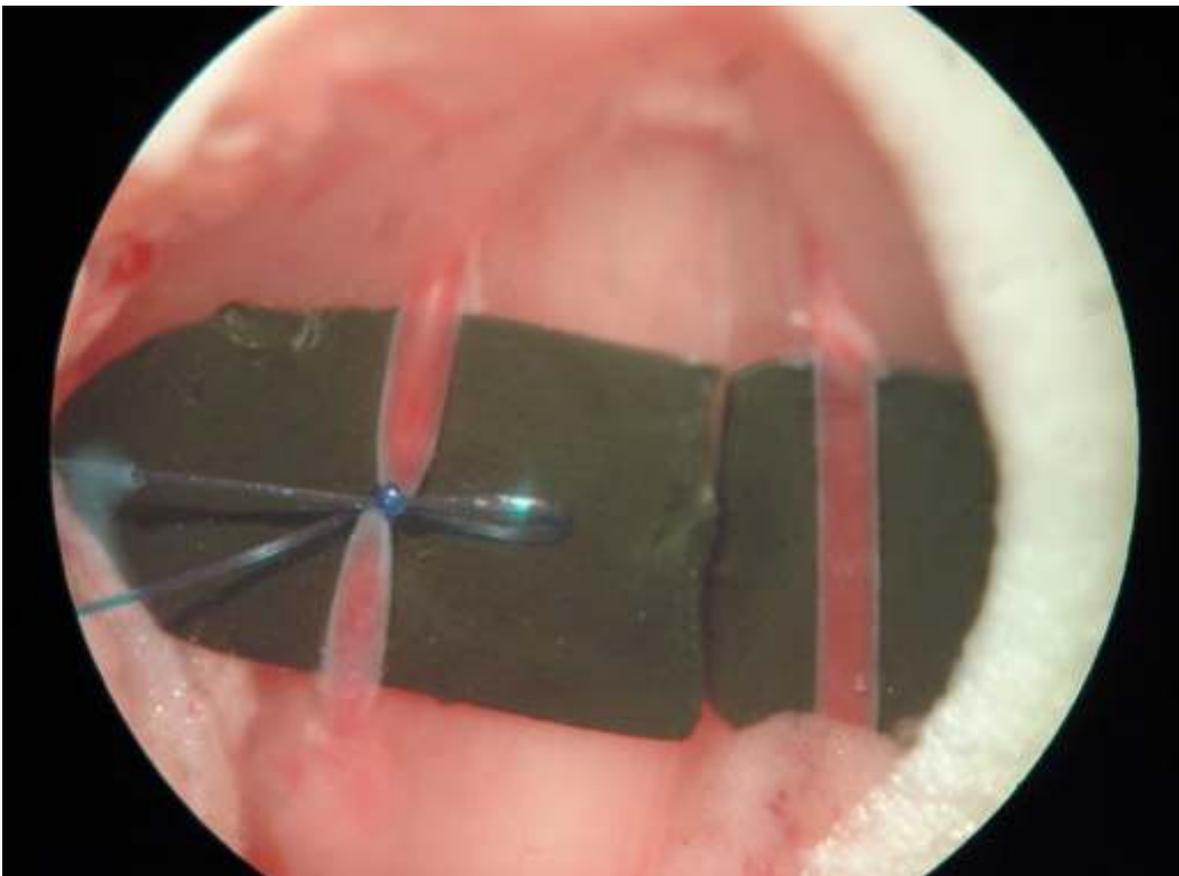


Abbildung 14: Ligatur der A. carotis communis

3.2.8.2 Intravitalmikroskopie am Dünndarm

Am Dünndarm wird in ähnlicher Weise verfahren. Die Aufnahmen werden in 200-facher Vergrößerung mit Wasserimmersion aufgenommen. Es erfolgen ebenfalls jeweils vier Aufnahmen von Arteriolen und Venolen pro Zeitfenster. Hier sind die Zeitpunkte folgendermaßen gewählt: vor Ischämie sowie 5, 10, 30, 60 und 90 Minuten nach Reperfusion. Die Ischämiedauer beträgt eine Stunde und wird durch die Ligatur des versorgenden Mesenterialgefäßes sowie beider Enden des betroffenen Darmabschnittes erreicht. Nach einer Stunde werden die Ligaturen gelöst und die Reperfusion setzt ein. Um ein zusätzliches Auskühlen und Austrocknen des Darmsegmentes zu verhindern, wird der Darm während der Ischämiephase reponiert. Um den Kreislauf des Tieres zu unterstützen erfolgt eine Infusion mit Ringerlactatlösung (Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg). In *Abbildung 15* ist der Dünndarm während der Ischämiephase zu sehen.

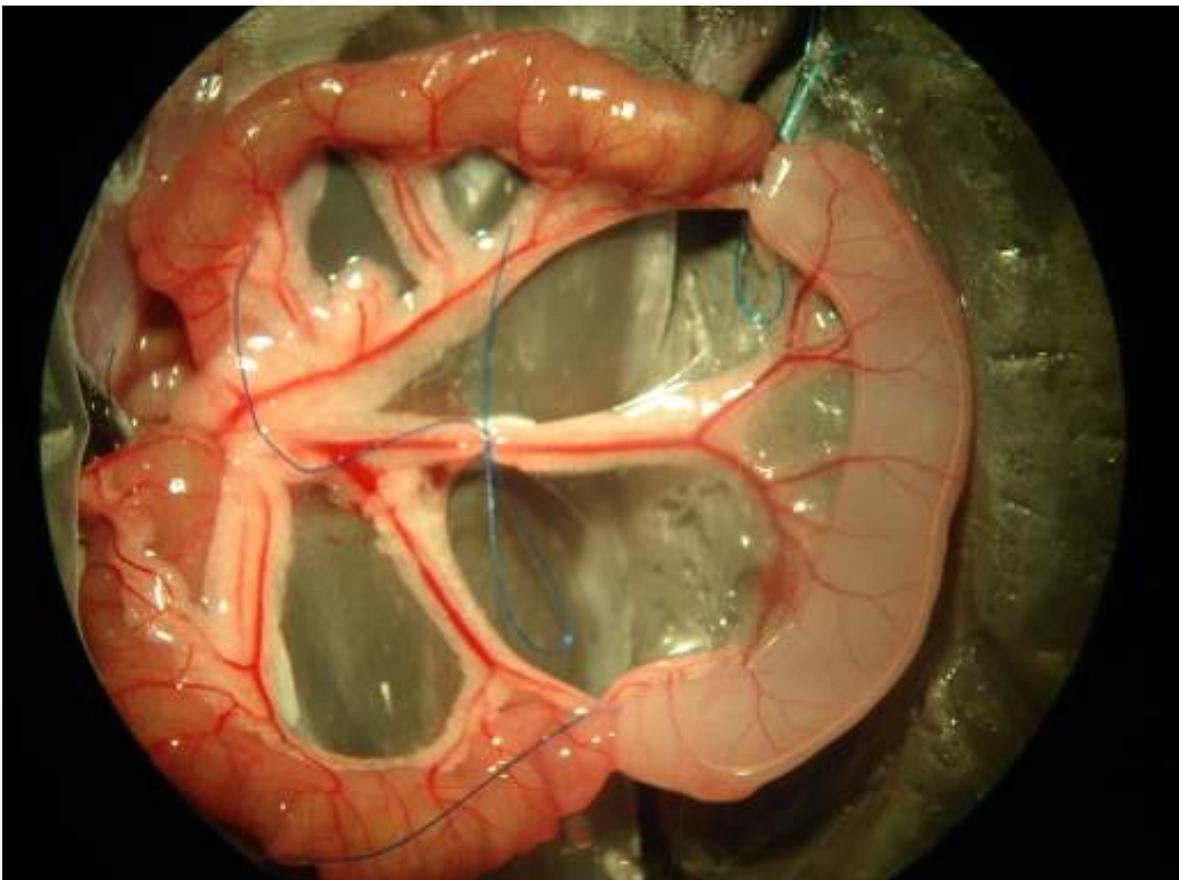


Abbildung 15: Dünndarm während der Ischämiephase

3.2.9 Dokumentation und Auswertung der IVM-Aufnahmen

Für jeden Versuch und jedes Tier wird ein Datenblatt angelegt, in dem Informationen über das Versuchstier wie Tierstamm, Geschlecht, Alter, Fütterung sowie das Versuchsdatum eingetragen werden. Außerdem ist ein kurzes Versuchsprotokoll enthalten und ein Vermerk, ob eine Organentnahme oder Färbung stattfinden soll. In dieses Datenblatt können auch Besonderheiten oder Komplikationen, die während der Durchführung des Versuches auftreten, eingetragen werden.

Durch die Angabe des Zählerstandes der Aufzeichnungen können die einzelnen Sequenzen dem entsprechenden Tier zugeordnet werden. Die CDs werden ebenfalls mit dem Versuchsdatum und der Projektbezeichnung gekennzeichnet, um eine genaue Zuordnung zu gewährleisten. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgt in einem abgedunkelten Raum. Der Gefäßdurchmesser wird mit Hilfe einer Schablone mit angepasstem Maßstab auf dem Monitor ausgemessen. Im Anschluss daran werden die einzelnen Videosequenzen ausgewertet. Die Auszählung der Zellen erfolgt ebenfalls über eine Schablone mit einem Fenster, welches bei 200-facher Vergrößerung eine definierte Größe von 150µm Länge und 100µm Breite hat.

Es werden zuerst die adhärenen Zellen gezählt. Als adhärenente Zellen werden hierbei diejenigen Zellen, die 15 Sekunden oder länger an der gleichen Stelle am Endothel haften, definiert. Zellen, die kürzer als 15 Sekunden am Endothel haften, werden in die Gruppe der transient adhärenen Zellen eingestuft. Letztendlich werden noch alle Zellen ausgezählt, die über die gesamte Strecke des Auszählfensters (150µm) rollen. Somit erhält man eine Einteilung der Zellen in drei Gruppen: adhärenente, transient adhärenente und rollende Zellen. Die Werte werden in eine Tabellenvorlage eingetragen und beurteilt.

3.2.10 Histologische Untersuchung

Nach der Tötung der Tiere erfolgt die Entnahme der Carotiden bzw. der Dünndarmsegmente für die histologische Untersuchung. Die jeweiligen Gewebe werden in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt. Mit Hilfe der verschiedenen Färbungen kann das verletzte Endothel dargestellt werden.

Die Entwässerung der mit Formalin fixierten Gewebe erfolgt über eine aufsteigende Alkoholreihe. Nach der Wasserverdrängung ist außerdem ein Intermedium wie Xylol

erforderlich, da Alkohol und Paraffin nicht mischbar sind. Das Untersuchungsmaterial verbleibt zwei Stunden in einem Xylobad und wird anschließend für mindestens zwei Stunden in flüssiges, ca. 60°C warmes Paraffin gegeben. Somit wird eine vollständige Durchtränkung erreicht, bevor die Gewebeproben in Paraffinblöcke eingebettet werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Gefäße und Därme senkrecht zur Schnittrichtung eingebettet werden. Nach dem Erkalten der Paraffinblöcke werden die eingebetteten Gewebe mit Hilfe eines Mikrotoms (Fa. Leica Instruments GmbH, Modell: 2045 Multicut, Nussloch) in 5µm dicke Schnitte geschnitten. Jeweils zwei Schnitte in Folge werden nach kurzem Einbringen in ein 35°C warmes Streckbad mit destilliertem Wasser auf einen Objektträger aufgezogen. Nachdem die Objektträger getrocknet sind, folgt die Entparaffinisierung mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe sowie die gewünschte Färbung. Die durchgeführten Färbungen erfolgen nach einem gängigen Protokoll (WEYRAUCH und SMOLLICH 1998).

3.2.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der mit sauren Bestandteilen der Zelle, wie den Nucleinsäuren des Zellkerns oder des rauen endoplasmatischen Retikulums reagiert. Diese Strukturen stellen sich demnach bläulich dar. Die andere Komponente dieser Färbung ist der saure Farbstoff Eosin, der mit basischen Bestandteilen der Zelle wie dem Zytoplasma und der Interzellularsubstanz reagiert, die rötlich erscheinen.

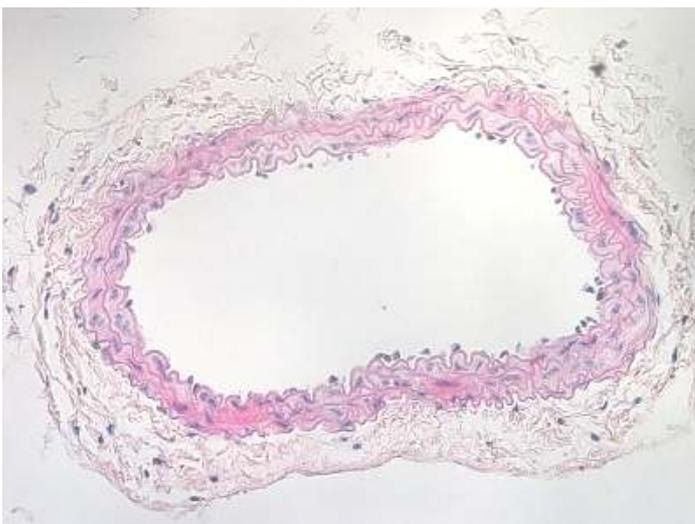


Abbildung 16: A. carotis communis, HE, 20er Objektiv



Abbildung 17: Dünndarm, HE, 4er Objektiv

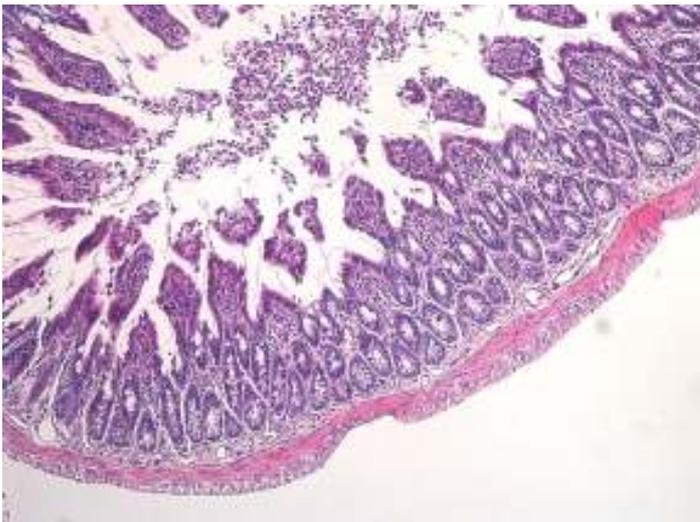


Abbildung 18: Dünndarm, HE, 10er Objektiv

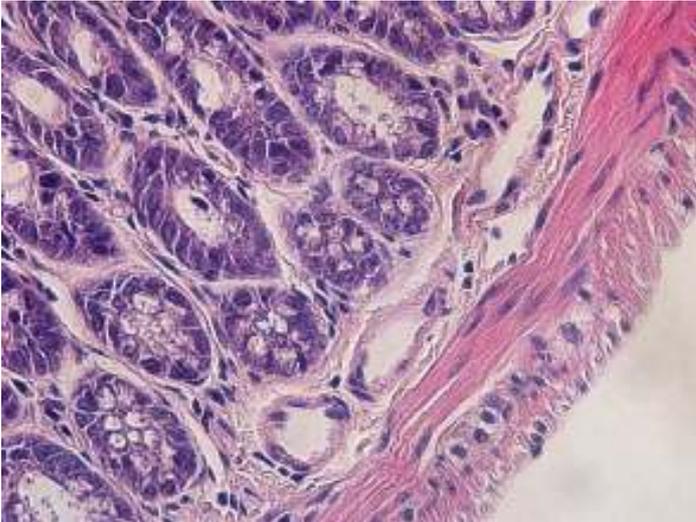


Abbildung 19: Dünndarm, HE, 40er Objektiv

3.2.10.2 Elastica van Giesson Färbung (EvG-Färbung)

Bei dieser zu den Trichrom-Färbungen gehörenden Färbung stellen sich die Zellkerne schwarz, das Zytoplasma gelb und das Interstitium rot dar. Besonders deutlich ist bei dieser Färbung die Unversehrtheit der Gefäßwand zu erkennen. Die Lamina elastica interna und externa ist bei den Schnitten deutlich als dunkle wellenförmige Linie zu sehen.



Abbildung 20: A. carotis communis, EvG, 20er Objektiv

3.2.11 Statistische Berechnungen

Die Ergebnisse sind, wenn nicht abweichend angegeben, als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Der Standardfehler SEM („Standard error of the mean“) dient zur Berechnung der Streuung der Mittelwerte und wird als der Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel des Stichprobenumfangs definiert.

Ein nicht parametrischer, unverbundener Test dient zur statistischen Berechnung. Die Mittelwerte der jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppe werden mit dem t-Test verglichen und auf ihre Signifikanz hin überprüft. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant definiert und ist in den Schaubildern mit einem Stern markiert. Die statistischen Berechnungen erfolgen mit dem Programm GraphPad Prism (Version 3.0, Fa. GraphPad Software Incorporated).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Allgemeine Darstellung der Versuche

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen werden sechs bis acht Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse herangezogen. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie können Interaktionen von fluoreszenzmarkierten Zellen am Gefäßendothel optisch dargestellt werden. Die einzelnen Versuche werden gruppenweise jeweils an einem ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis sowie an einem Ischämie-Reperfusionsmodell des Dünndarms durchgeführt. Dadurch können die Ergebnisse beider Modelle später verglichen werden.

Innerhalb der beiden Modelle werden wiederum Untergruppen gebildet, bei denen mit unterschiedlichen Zellen gearbeitet wird. In der ersten Versuchsgruppe werden humane Endothelzellen eingesetzt, in der zweiten Versuchsgruppe humane CD34⁺ Progenitorzellen. Diese beiden Gruppen werden verglichen. In der dritten Gruppe werden die CD34⁺ Progenitorzellen mit einem Konstrukt vorinkubiert und eine Kontrolle dazu durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist in beiden Modellen identisch.

Zudem erfolgt eine Unterscheidung in fest adhärenente, transient adhärenente und am Gefäßendothel entlang rollende Zellen. Die fest adhärenenten Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie länger als 15 Sekunden an derselben Stelle des Gefäßendothels haften bleiben, wohingegen die transient adhärenenten Zellen weniger als 15 Sekunden haften. Zu der Gruppe der rollenden Zellen werden nur diejenigen Zellen gezählt, die über die gesamte Strecke der zur Auswertung verwendeten Schablone (150µm) rollen. *Tabelle 3* gibt einen Überblick über den Ablauf der durchgeführten Versuche.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ligaturinduziertes Verletzungsmodell der Carotis	a) Versuche mit humanen Endothelzellen (n=12) b) Versuche mit CD34 ⁺ Progenitorzellen (n=6) c) Versuche mit CD34 ⁺ Zellen, vorinkubiert mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 (n=9) bzw. d) Versuche mit CD34 ⁺ Zellen, vorinkubiert mit den Einzelkomponenten als Kontrolle (n=8)
Ischämie-Reperfuisionsmodell am Dünndarm	a) Versuche mit humanen Endothelzellen (n=6) b) Versuche mit CD34 ⁺ Progenitorzellen (n=6) c) Versuche mit CD34 ⁺ Zellen, vorinkubiert mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 (n=5) d) Versuche mit CD34 ⁺ Zellen, vorinkubiert mit den Einzelkomponenten als Kontrolle (n=5)

Tabelle 3: Übersicht über den Versuchsaufbau.

3.3.2 Intravitalmikroskopische Untersuchungen im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der Arteria carotis communis

3.3.2.1 Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen

Die folgenden Schaubilder zeigen die Verteilung humaner Endothelzellen im Vergleich zu humanen CD34⁺ Progenitorzellen im Carotismodell der Maus. Der Erstellung der Schaubilder liegen die ausgewerteten intravitalmikroskopischen Aufnahmen zu Grunde, wobei eine manuelle Auszählung der Zellen erfolgt, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen. Hierbei wird zwischen fest adhärenenten, transient adhärenenten und am Gefäßendothel entlang rollenden Zellen unterschieden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird die Anzahl der Zellen pro mm² angegeben. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte sind signifikant für p<0,05. Dies trifft auf sämtliche nachfolgende Schaubilder zu.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

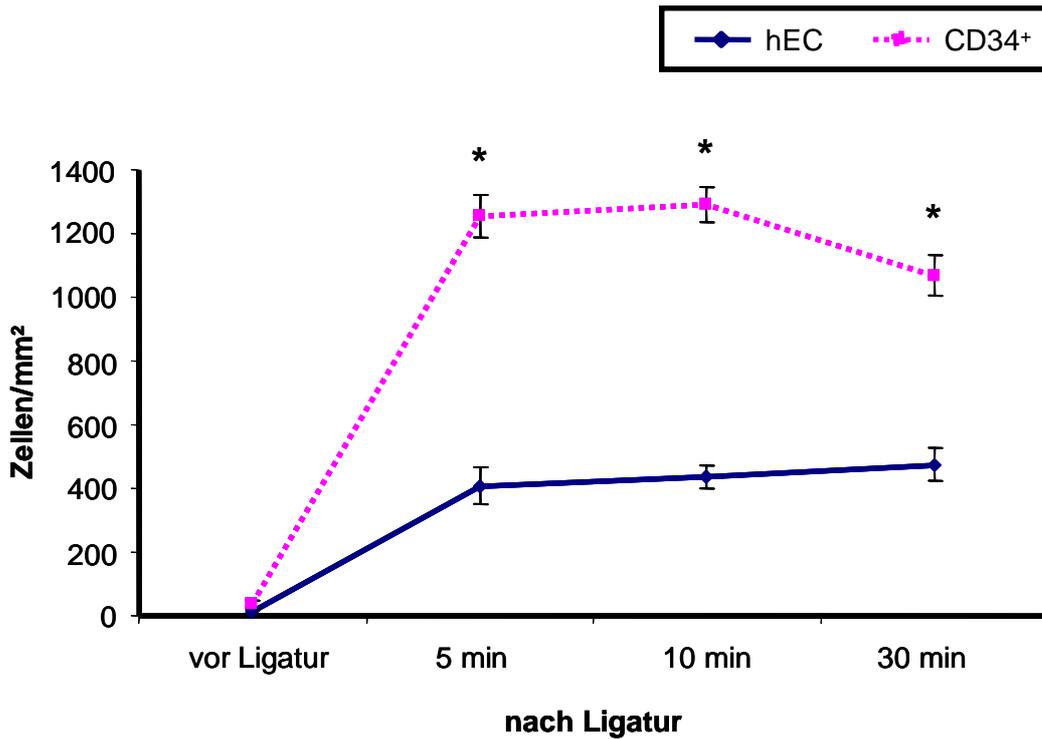


Abbildung 21: Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen im Carotismodell (hEC: n=12; CD34⁺: n=6).

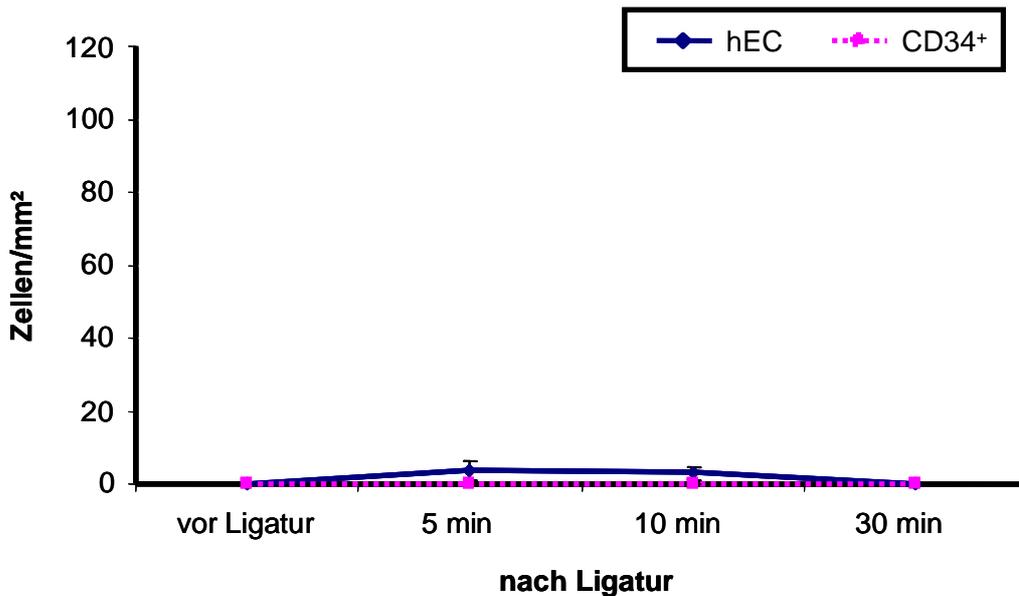


Abbildung 22: Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen im Carotismodell (hEC: n=12; CD34⁺: n=6).

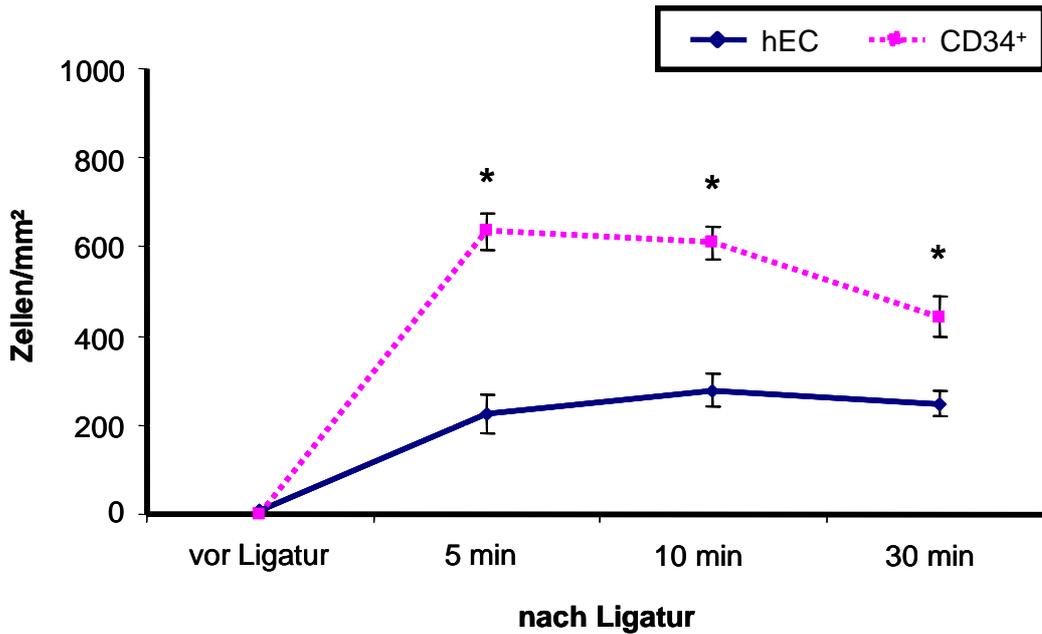


Abbildung 23: Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen im Carotismodell (hEC: n=12; CD34⁺: n=6).

Sowohl bei den humanen Endothelzellen als auch bei den humanen CD34⁺ Progenitorzellen machen die transient adhärenenten Zellen den größten Anteil an Zellen aus, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen (transiente humane Endothelzellen [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min nach Ligatur]: [14,363 ± 5,947 (SEM); 406,242 ± 57,724; 434,986 ± 36,383; 474,559 ± 51,837] und transiente CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min nach Ligatur]: [37,549 ± 12,206; 1256,349 ± 66,848; 1289,141 ± 54,995; 1069,575 ± 63,709]).

Die zweithäufigste Gruppe stellen bei beiden Zelltypen die adhärenenten Zellen dar (adhärente humane Endothelzellen [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min nach Ligatur]: [7,136 ± 3,304 (SEM); 223,733 ± 43,085; 278,762 ± 38,306; 248,032 ± 28,962] und adhärente CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min nach Ligatur]: [0; 634,315 ± 39,788; 609,050 ± 37,535; 442,424 ± 46,162]).

Zellen, die am Endothel entlang rollen, kommen bei humanen Endothelzellen sowie bei humanen CD34⁺ Progenitorzellen kaum bzw. gar nicht vor (rollende humane Endothelzellen [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min nach Ligatur]: [0; 3,669 ± 2,492; 2,891 ± 1,949; 0] und rollende CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min nach Ligatur]: [0; 0; 0; 0]).

3.3.2.2 Vergleich des bispezifischen Adhäsionsmolekül mit der Kontrollgruppe

In den nachfolgenden Schaubildern wird die Versuchsgruppe, in der das bispezifische Adhäsionsmolekül zum Einsatz kam, mit der Kontrollgruppe, bei der die Einzelkomponenten des Konstruktes verwendet wurden, verglichen. Es erfolgt wiederum eine Unterscheidung in adhärenente, transient adhärenente und rollende Zellen.

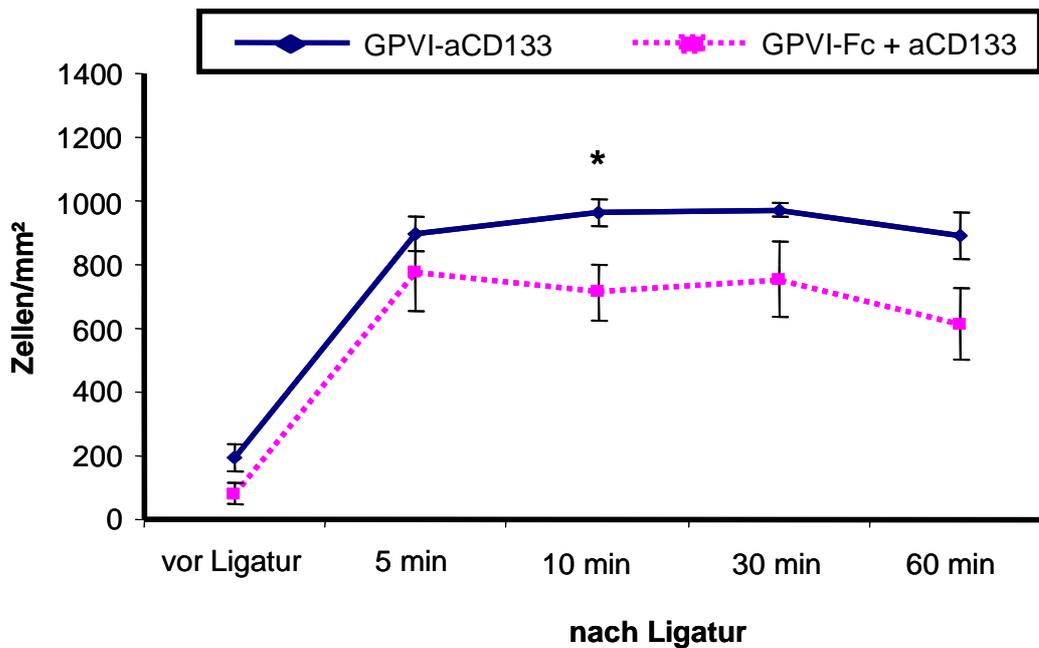


Abbildung 24: Transient adhärenente Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle im Carotismodell (GPVI-aCD133: n=9; GPVI-Fc und aCD133: n=8).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

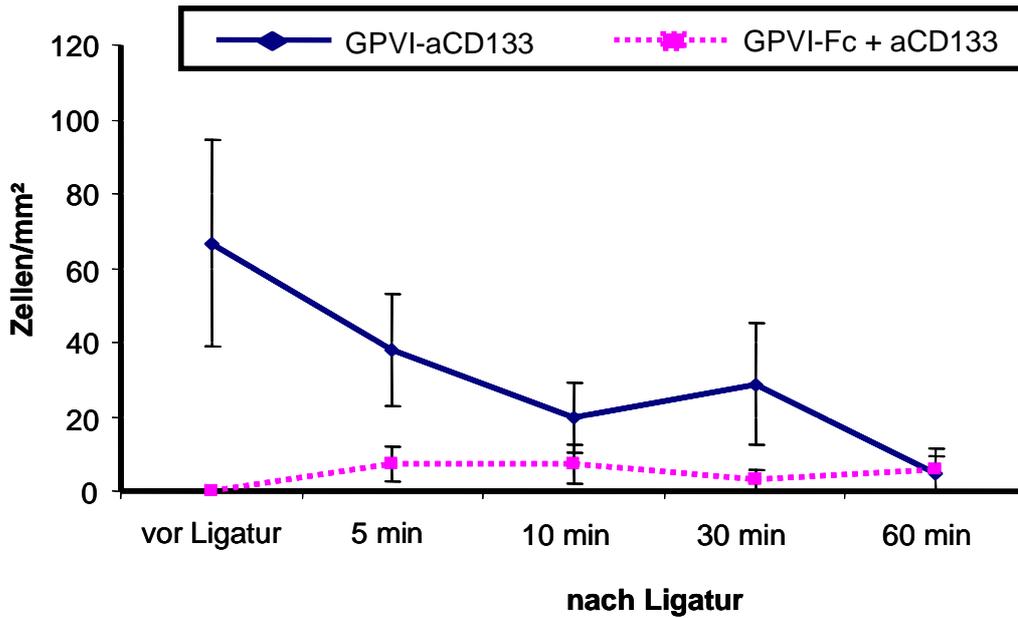


Abbildung 25: Rollende Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle im Carotismodell (GPVI-aCD133: n=9; GPVI-Fc und aCD133: n=8).

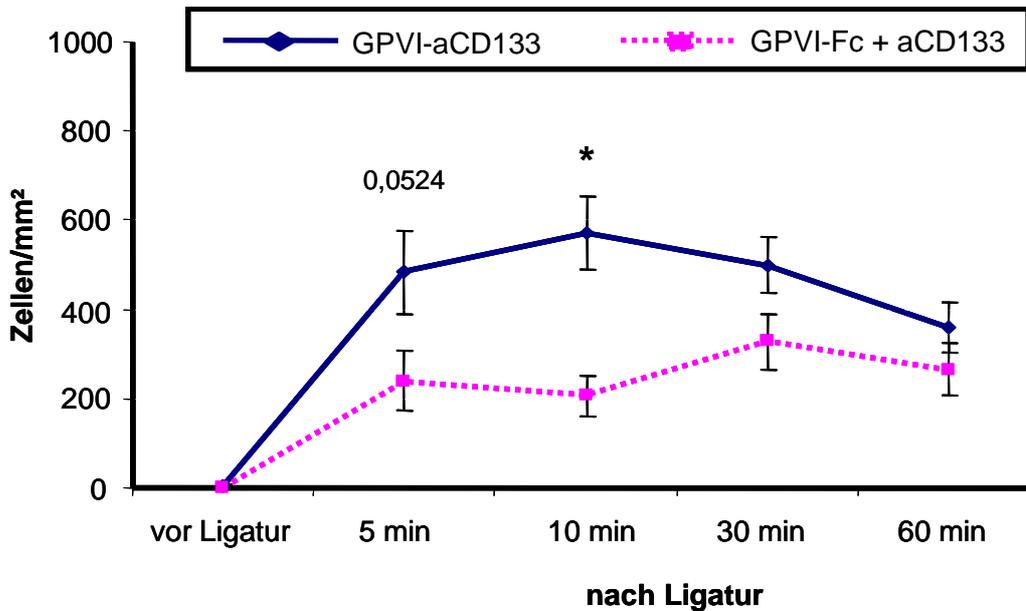


Abbildung 26: Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle im Carotismodell (GPVI-aCD133: n=9; GPVI-Fc und aCD133: n=8).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Den größten Anteil an Zellen, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, macht erneut die Gruppe der transient adhärenen Zellen aus (transient adhärenente Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [195,764 ± 41,959; 897,503 ± 53,511; 963,075 ± 42,617; 970,772 ± 20,961; 888,063 ± 72,599] versus transient adhärenente Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [80,126 ± 33,259; 775,784 ± 120,653; 713,321 ± 88,114; 754,486 ± 118,727; 612,924 ± 111,442]).

Die fest adhärenen Zellen weisen in beiden Gruppen die zweithäufigste Verteilung auf (adhärenente Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [5,820 ± 4,113; 483,852 ± 92,111; 571,242 ± 80,915; 499,073 ± 62,219; 358,741 ± 56,758] versus Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [0, 240,017 ± 65,531; 206,799 ± 45,833; 328,118 ± 62,950; 265,198 ± 57,819]).

Zellen, die am Endothel entlang rollen, stellen den kleinsten Anteil dar (rollende Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [66,720 ± 27,571; 38,147 ± 15,050; 19,761 ± 9,221; 28,727 ± 16,348; 4,625 ± 4,625] versus rollende Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]: [0; 7,195 ± 4,833; 7,405 ± 5,134; 2,875 ± 2,875; 5,776 ± 5,776]).

Die Einzeldaten der Versuche des Carotismodells sind vollständig im Anhang aufgelistet.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Bilder intravitalmikroskopischer Aufnahmen. Auf *Abbildung 27* bis *32* ist die Arteria carotis einer Maus vor und nach Ligatur zu sehen, wobei die hellen Punkte die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF gefärbten Zellen darstellen. Die Pfeile markieren jeweils beispielhaft eine Auswahl an adhärenen Zellen. Auf den beiden oberen Bildern vor Verletzung (Ligatur) haften kaum Zellen. Deutlich ist der Unterschied an adhärenen Zellen bei Verwendung des Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 im Vergleich zu der Kontrollgruppe, bei der die Einzelkomponenten des Konstruktes zum Einsatz kamen, zu erkennen.

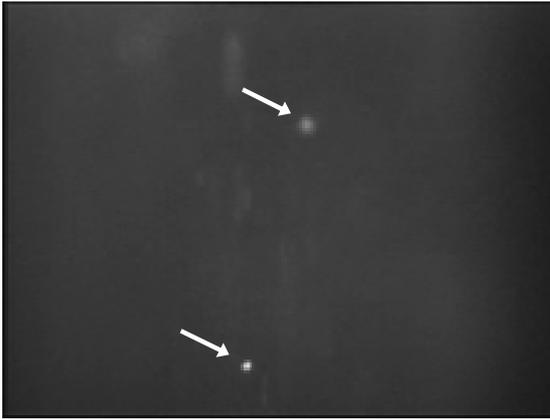


Abbildung 27: GPVI-aCD133 vor Ligatur.



Abbildung 28: GPVI-Fc + aCD133 vor Ligatur.

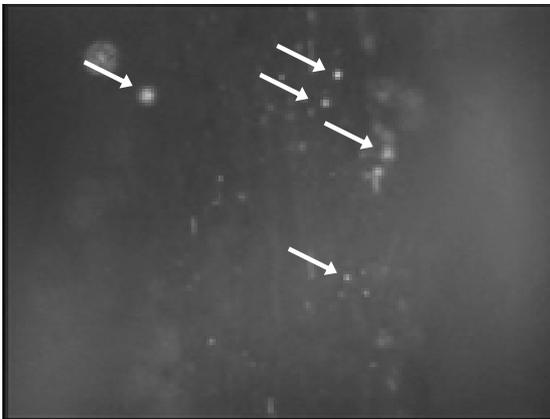


Abbildung 29: GPVI-aCD133 5 Minuten nach Ligatur.

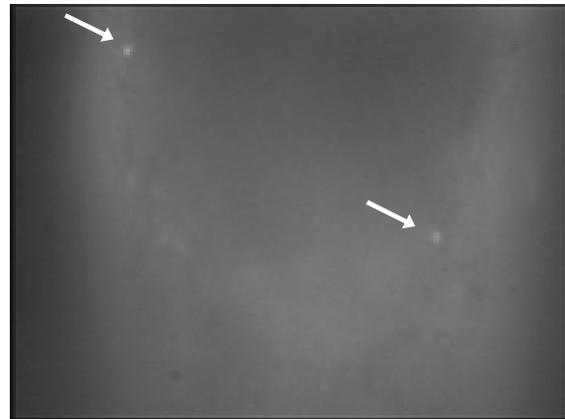


Abbildung 30: GPVI-Fc + aCD133 5 Minuten nach Ligatur.

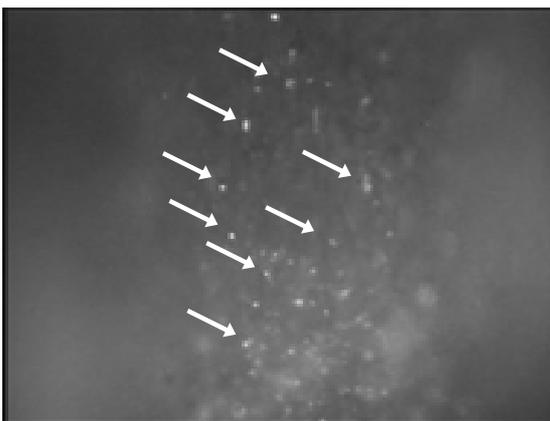


Abbildung 31: GPVI-aCD133 30 Minuten nach Ligatur.



Abbildung 32: GPVI-Fc + aCD133 30 Minuten nach Ligatur.

3.3.3 Intravitalmikroskopische Untersuchungen im Ischämie-Reperusionsmodell des Dünndarmes

3.3.3.1 Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Arteriolen

In den nachfolgenden Schaubildern wird die Verteilung der humanen Endothelzellen im Vergleich zu der Verteilung der humanen CD34⁺ Progenitorzellen in den Arteriolen des Dünndarmes dargestellt. Die einzelnen Zeitpunkte geben die Anzahl der Zellen pro mm² an, die entweder eine feste Adhäsion zeigen, transient adhären sind oder am Gefäßendothel entlang rollen. Die Darstellung basiert auf der Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen, die die Interaktionen der Gefäßwand mit den fluoreszenzmarkierten Zellen wiedergibt.

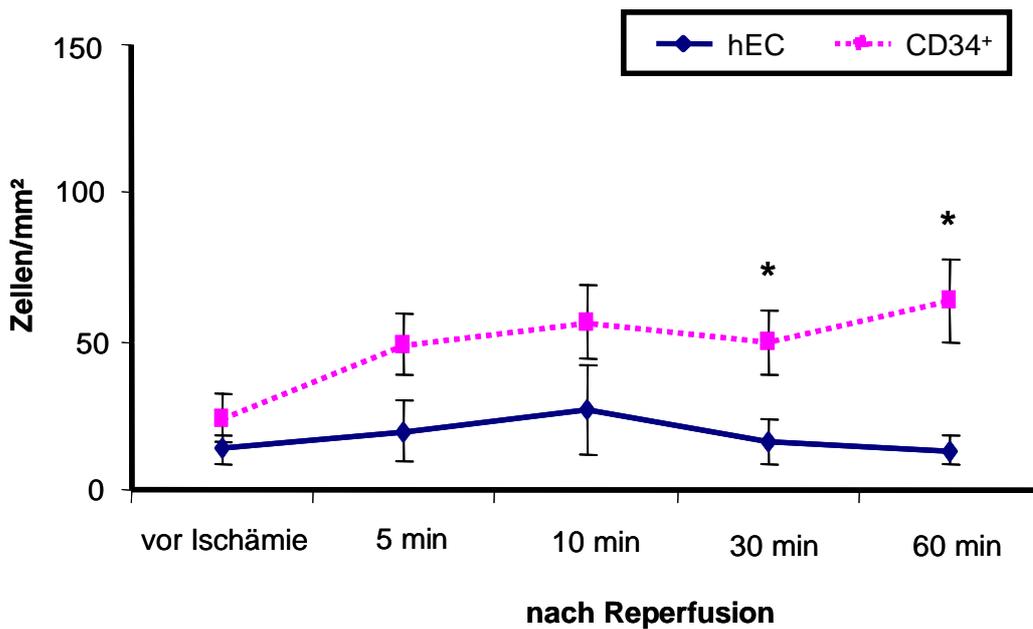


Abbildung 33: Transient adhärenente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Arteriolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34⁺: n=6).

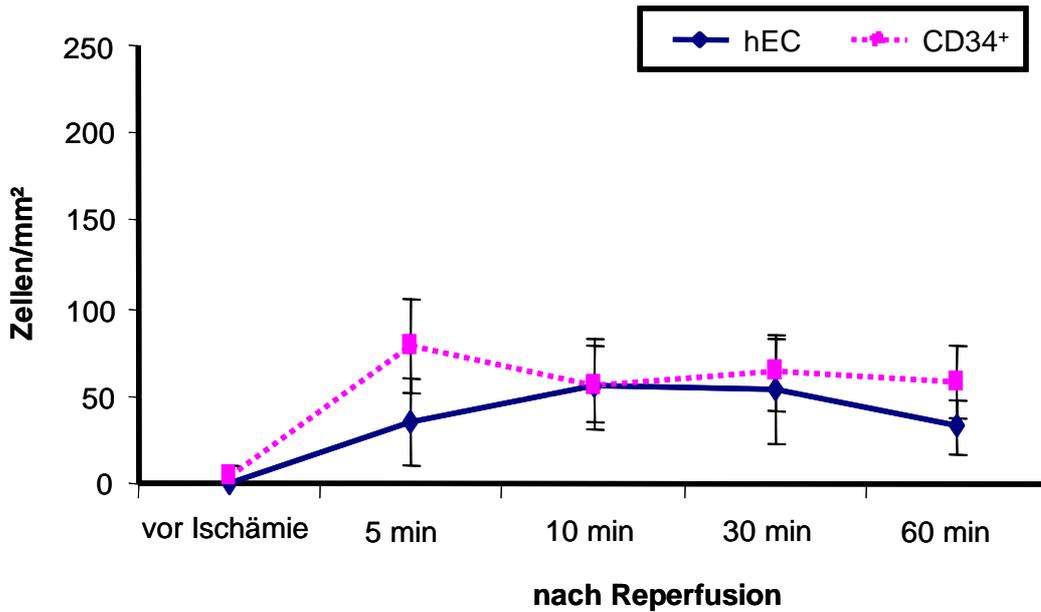


Abbildung 34: Rollende Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Arteriolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34⁺: n=6).

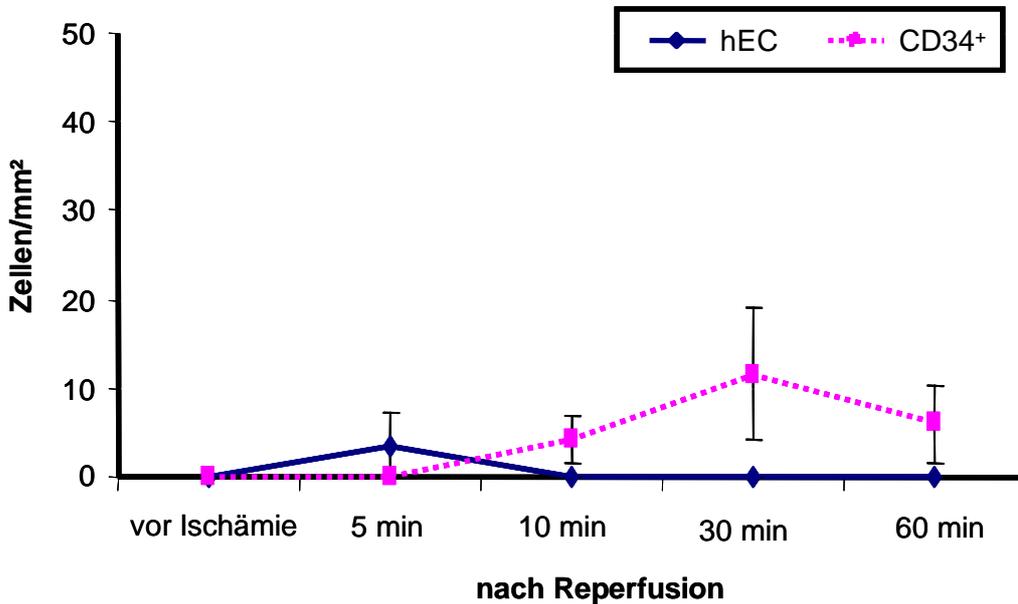


Abbildung 35: Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Arteriolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34⁺: n=6).

In den Schaubildern wird deutlich, dass sowohl bei den humanen Endothelzellen als auch bei den humanen CD34⁺ Progenitorzellen die rollenden Zellen den größten Anteil an Zellen ausmachen, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen (rollende humane Endothelzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [0;

35,755 ± 24,602; 56,406 ± 25,919; 53,551 ± 29,880; 32,322 ± 15,927] versus rollende CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [5,053 ± 5,053; 78,063 ± 26,391; 56,750 ± 22,023; 63,157 ± 22,369; 57,741 ± 20,615]).

Die zweithäufigste Gruppe stellen die transient adhärenen Zellen dar, die weniger als 15 Sekunden an derselben Stelle am Gefäßendothel haften (transient adhärenente humane Endothelzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [13,726 ± 5,022; 19,768 ± 10,044; 26,764 ± 14,914; 16,534 ± 7,681; 13,328 ± 4,801] versus transient adhärenente CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [24,204 ± 7,728; 49,070 ± 10,304; 56,494 ± 12,247; 49,647 ± 10,604; 63,517 ± 14,228]).

Zellen, die länger als 15 Sekunden am Endothel haften, bilden die Gruppe der adhärenen Zellen und machen den geringsten Anteil aus (adhärenente humane Endothelzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [0; 3,537 ± 3,537; 0; 0; 0] versus adhärenente CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [0; 0; 4,175 ± 2,648; 11,621 ± 7,391; 6,029 ± 4,392]).

3.3.3.2 Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Venolen

Die nachfolgenden Schaubilder zeigen den Vergleich der Interaktionen von humanen Endothelzellen mit der Gefäßwand und von humanen CD34⁺ Progenitorzellen mit der Gefäßwand in den Venolen des Dünndarmes.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

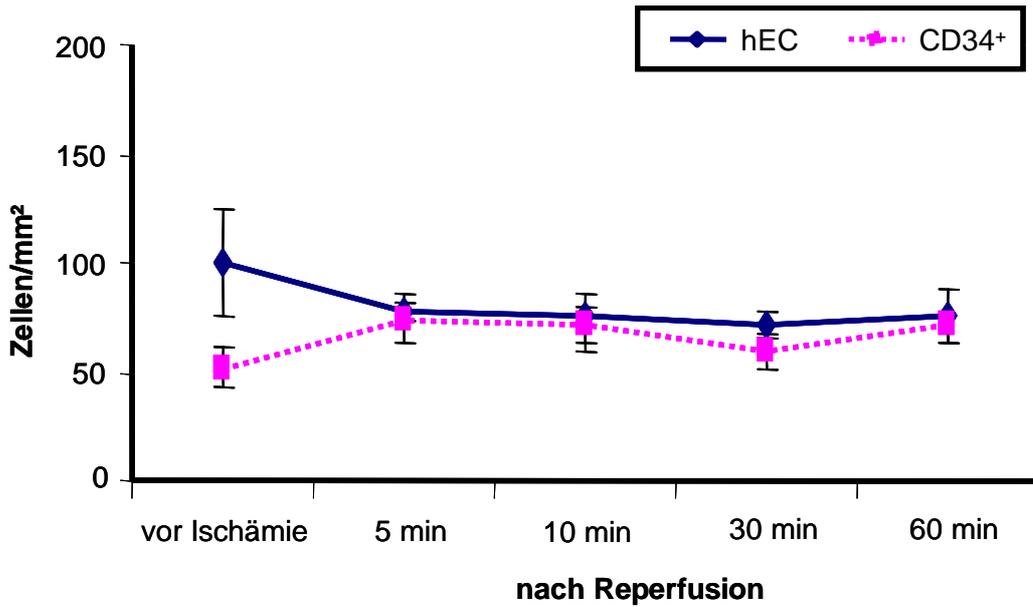


Abbildung 36: Transient adhärenente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Venolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34⁺: n=6).

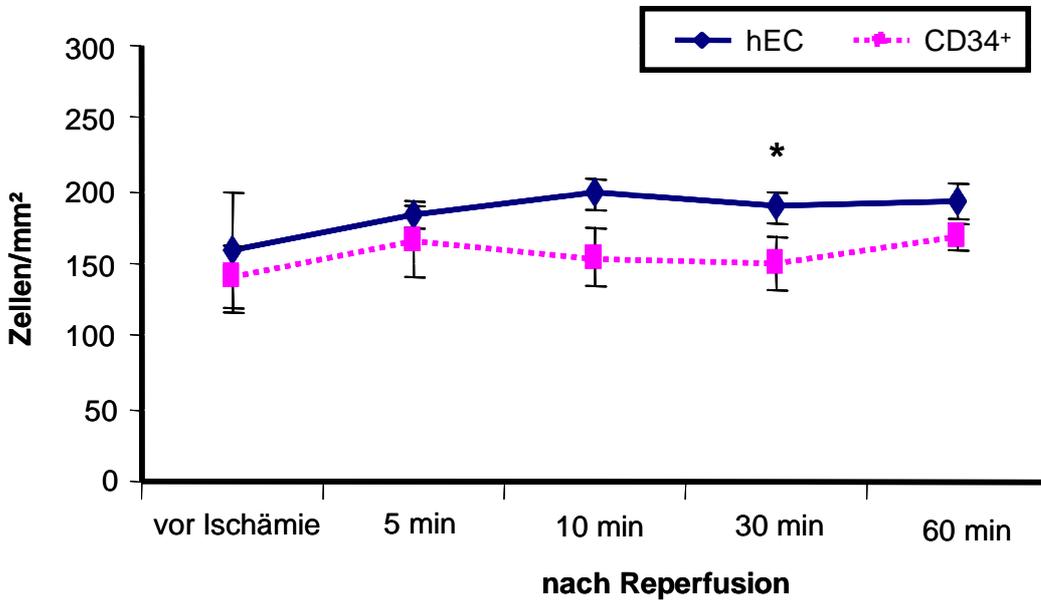


Abbildung 37: Rollende Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Venolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34⁺: n=6).

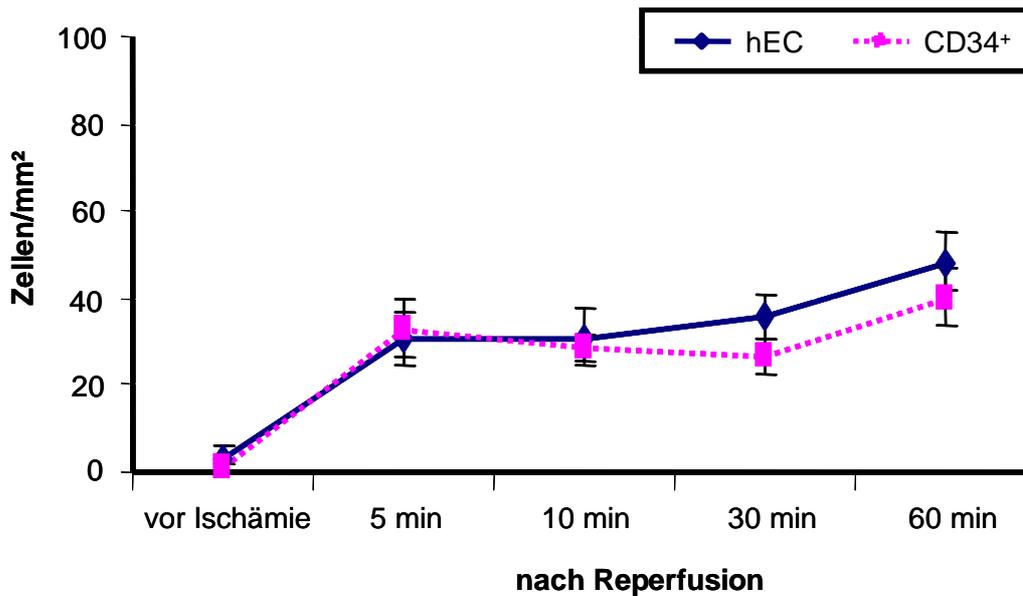


Abbildung 38: Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34⁺ Progenitorzellen in den Venolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34⁺: n=6).

Auch in diesen Versuchen machen die am Gefäßendothel entlang rollenden Zellen den größten Anteil an Zellen aus (rollende humane Endothelzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [159,887 ± 40,001; 183,931 ± 10,401; 197,911 ± 11,664; 188,406 ± 11,837; 193,690 ± 12,253] versus rollende CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [139,945 ± 23,792; 165,913 ± 19,103; 154,483 ± 17,965; 149,016 ± 8,231; 168,226 ± 12,576]).

Die transient adhärenente Zellen kommen bei beiden Zelltypen am zweithäufigsten vor (transient adhärenente humane Endothelzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [100,164 ± 23,848; 77,080 ± 4,594; 74,678 ± 11,350; 71,419 ± 6,995; 74,739 ± 12,344] versus transient adhärenente CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [51,154 ± 8,812; 73,580 ± 9,943; 71,167 ± 12,908; 58,899 ± 7,629; 72,071 ± 8,167]).

Den geringsten Anteil machen wie in den Arteriolen auch die adhärenente Zellen aus (adhärenente humane Endothelzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [3,200 ± 3,200; 30,650 ± 6,035; 30,965 ± 6,482; 35,507 ± 4,895; 48,229 ± 6,662] versus adhärenente CD34⁺ Progenitorzellen [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Reperfusion]: [0,804 ± 0,804; 33,013 ± 6,726; 28,836 ± 3,162; 26,445 ± 3,867; 40,146 ± 6,478]).

3.3.3.3 Vergleich des bispezifischen Adhäsionsmoleküls mit der Kontrollgruppe in den Arteriolen

Bei dieser Versuchsgruppe werden humane CD34⁺ Zellen verwendet, die mit dem bispezifischen Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 vorinkubiert wurden. Als Kontrolle dienen ebenfalls humane CD34⁺ Zellen, die jedoch mit den Einzelkomponenten des Adhäsionsmoleküls, GPVI-Fc und einem Antikörper gegen CD133 vorinkubiert wurden. Die Menge an zu injizierenden Zellen bleibt mit 50.000 Zellen in 250µl gleich wie in den vorherigen Versuchsgruppen.

Die nachfolgenden Schaubilder vergleichen die Anzahl transient adhärenter, adhärenter und rollender Zellen in der Gruppe, in der GPVI-aCD133 eingesetzt wurde, mit der Kontrollgruppe.

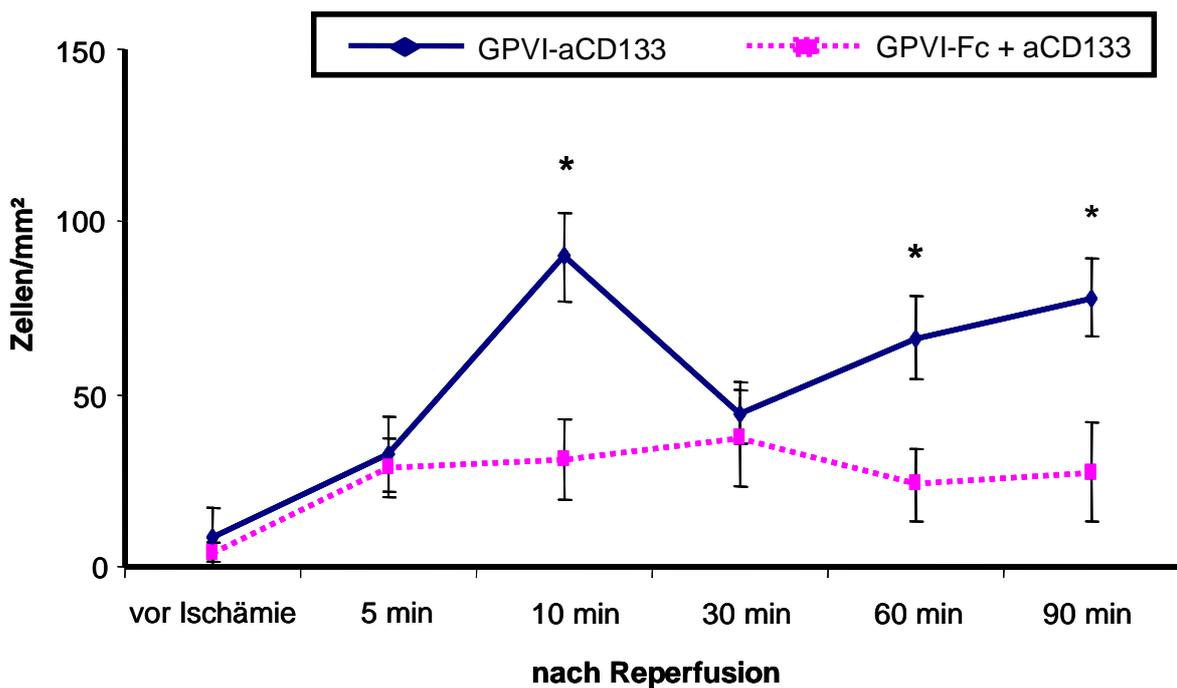


Abbildung 39: Transient adhärenente Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle in den Arteriolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

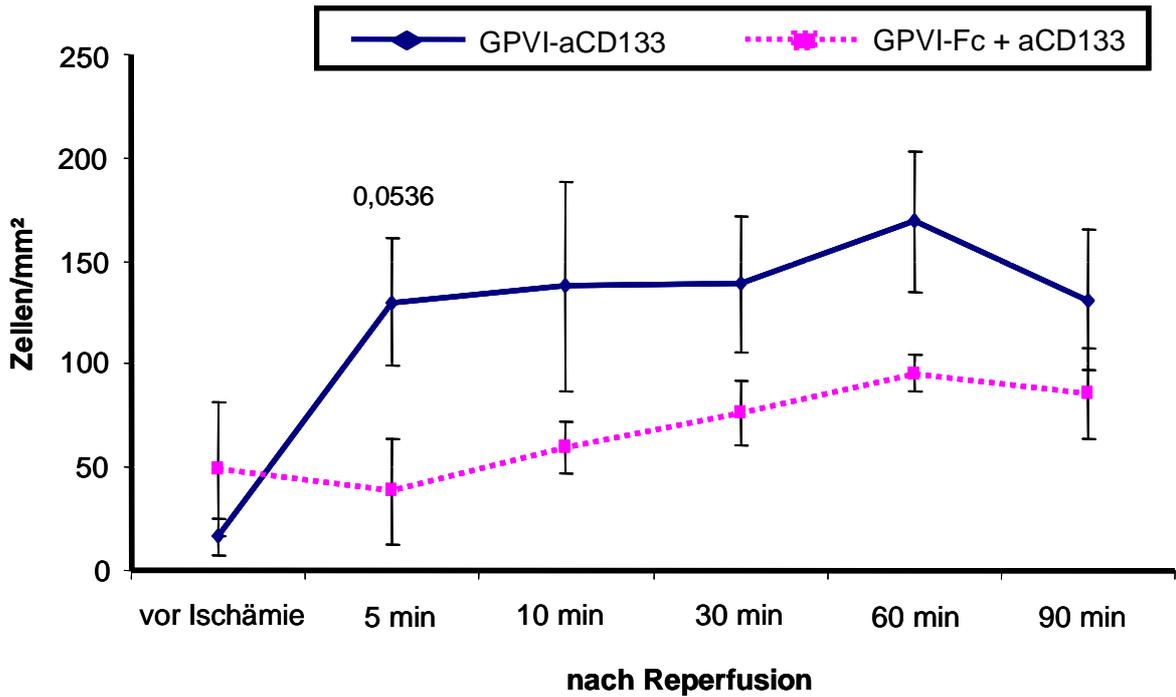


Abbildung 40: Rollende Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle in den Arteriolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).

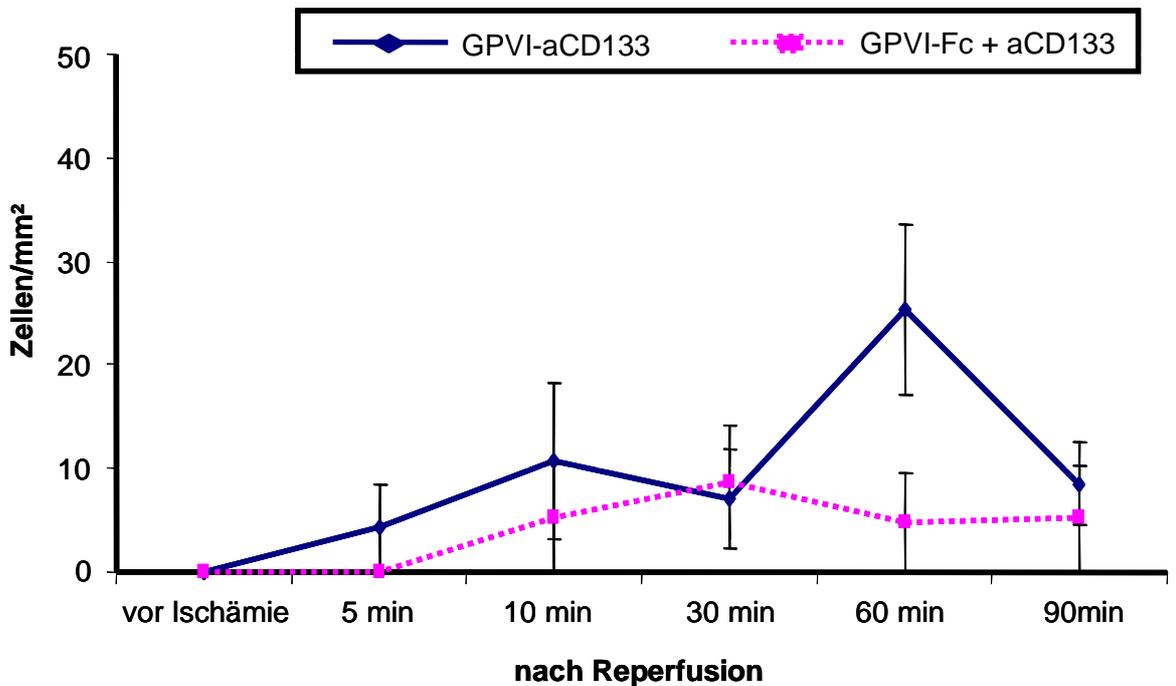


Abbildung 41: Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle in den Arteriolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).

Die rollenden Zellen machen erneut bei beiden Versuchsgruppen den größten Anteil aus (rollende Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [16,481 ± 8,725; 130,089 ± 31,218; 137,572 ± 50,582; 138,909 ± 33,036; 169,132 ± 34,111; 131,162 ± 34,359] versus rollende Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [49,338 ± 32,570; 38,273 ± 25,942; 59,411 ± 12,620; 76,212 ± 15,779; 95,655 ± 9,197; 85,624 ± 21,600]).

Den zweitgrößten Anteil machen bei beiden Versuchsgruppen die transient adhärenen Zellen aus (transient adhärenen Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [8,488 ± 8,488; 32,753 ± 10,656; 89,944 ± 12,736; 44,675 ± 8,863; 66,176 ± 12,045; 78,102 ± 11,327] versus transient adhärenen Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [4,067 ± 2,676; 28,421 ± 8,591; 31,336 ± 11,576; 37,126 ± 14,035; 23,853 ± 10,414; 27,578 ± 14,588]).

Als kleinste Gruppe sind auch hier die adhärenen Zellen zu nennen (adhärente Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [0; 4,244 ± 4,244; 10,711 ± 7,519; 7,074 ± 4,875; 25,276 ± 8,215; 8,544 ± 3,963] versus adhärente Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [0; 0; 5,255 ± 5,255; 8,650 ± 5,497; 4,850 ± 4,850; 5,154 ± 5,154]).

3.3.3.4 Vergleich des bispezifischen Adhäsionsmoleküls mit der Kontrollgruppe in den Venolen

In den nachfolgenden Schaubildern wird die Verteilung der CD34⁺ Zellen, die mit dem Konstrukt vorinkubiert wurden, mit den CD34⁺ Zellen, die mit den Einzelkomponenten vorinkubiert wurden, in den Venolen des Dünndarms verglichen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

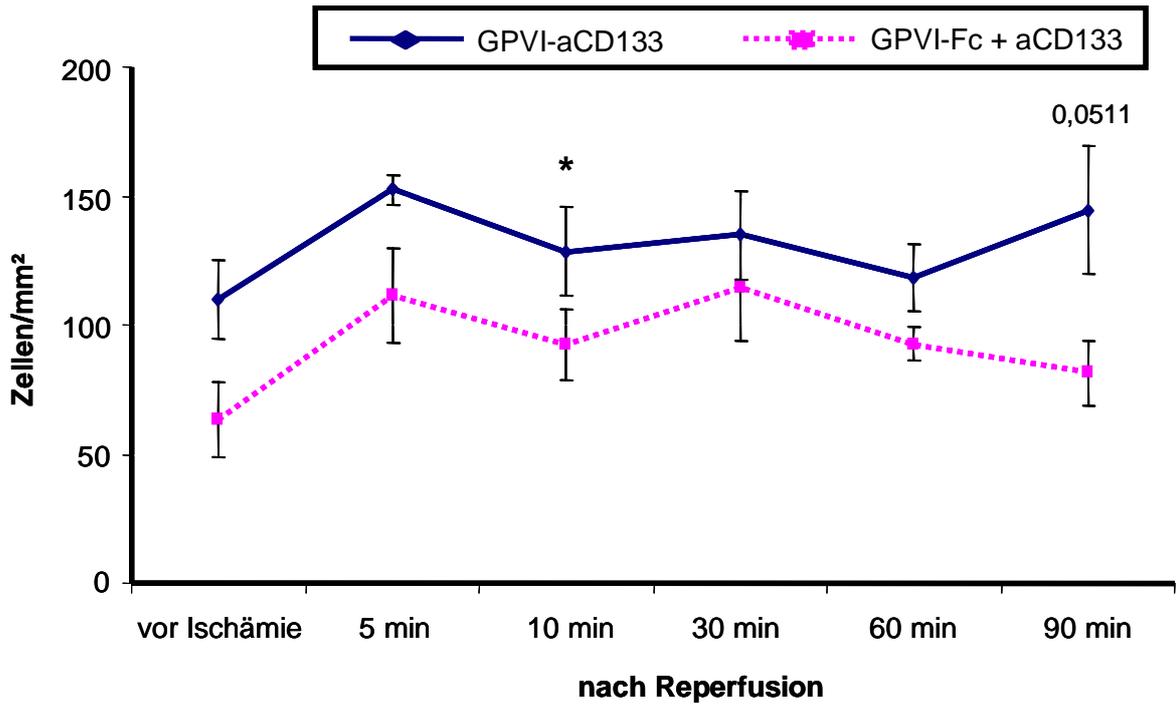


Abbildung 42: Transient adhärente Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle in den Venolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).

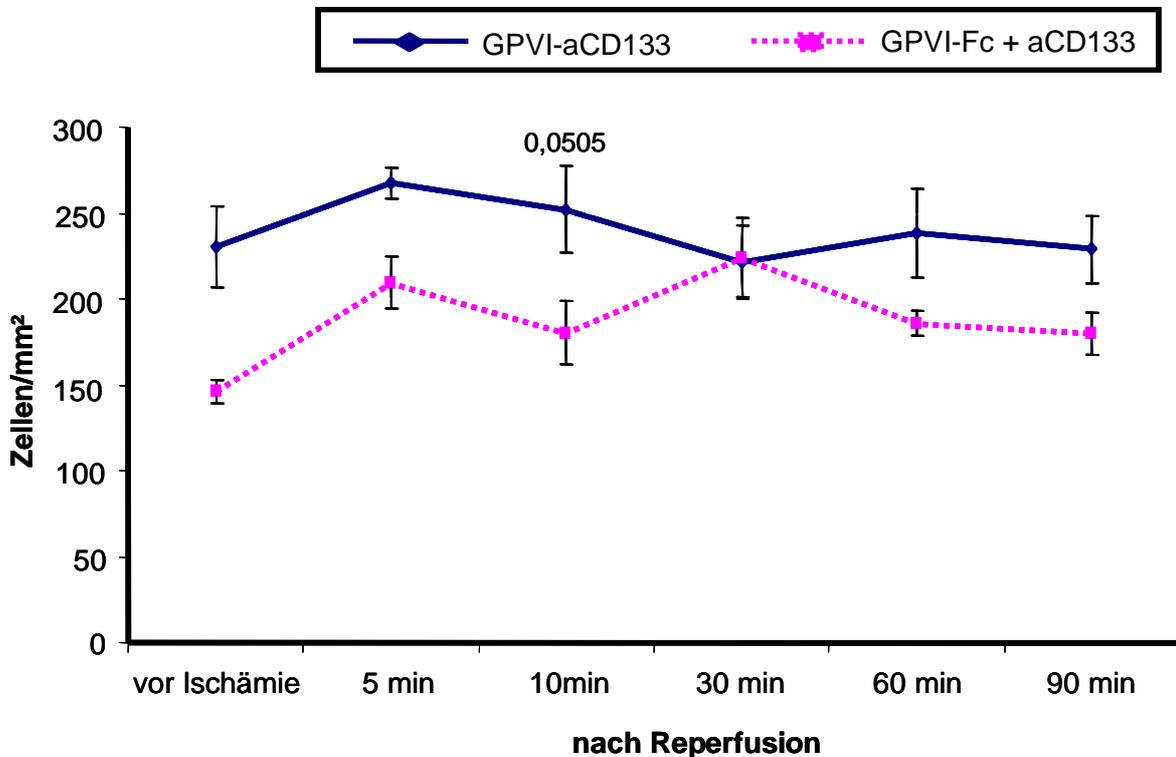


Abbildung 43: Rollende Zellen bei einem Vergleich von $CD34^+$ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle in den Venolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).

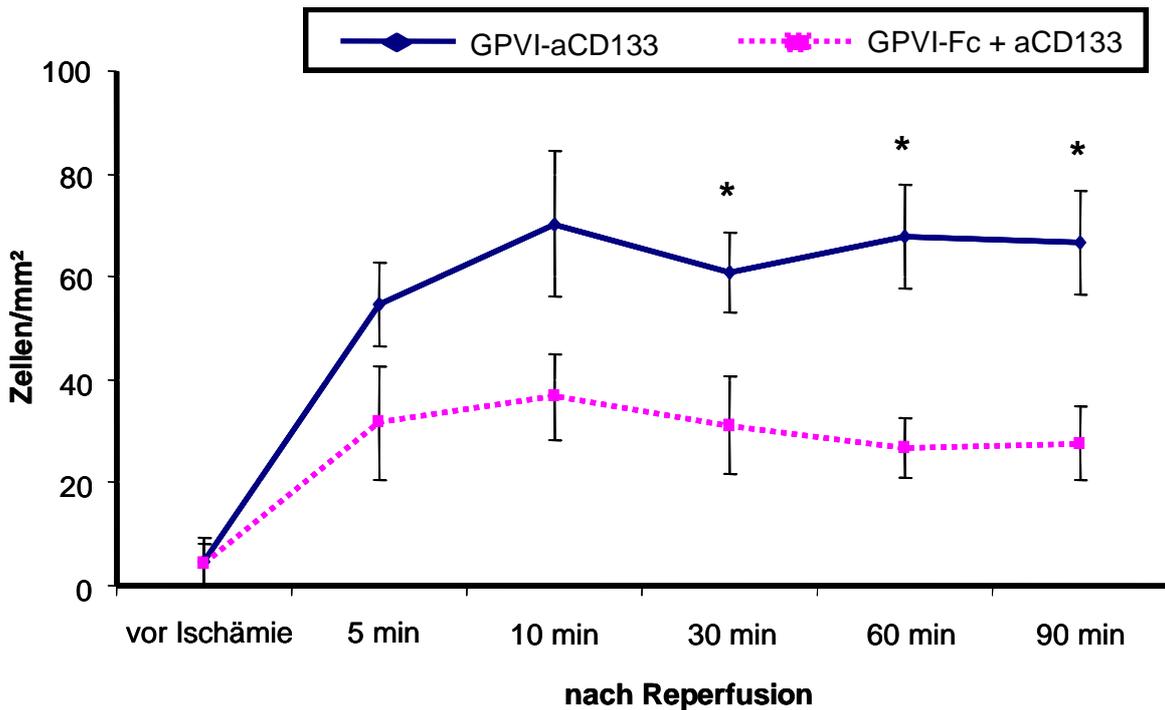


Abbildung 44: Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von CD34⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle in den Venolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).

Bei allen drei Anhaftungsarten liegt die blaue Kurve, die die Verwendung des Konstruktes darstellt, über der rosafarbenen Kurve der Kontrollgruppe. Wie bei den vorangegangenen Schaubildern stellen die rollenden Zellen den größten Anteil dar (rollende Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [230,141 ± 23,658; 267,010 ± 9,065; 252,160 ± 25,271; 221,743 ± 20,834; 238,646 ± 25,781; 228,766 ± 19,335] versus rollende Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [146,339 ± 6,805; 209,529 ± 14,742; 180,251 ± 18,419; 223,943 ± 23,445; 185,621 ± 7,081; 179,413 ± 12,489]).

Die transient adhärenente Zellen machen bei beiden Versuchsgruppen den zweitgrößten Anteil aus (transient adhärenente Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [109,876 ± 14,945; 152,538 ± 5,807; 128,420 ± 17,298; 134,751 ± 17,171; 118,262 ± 13,181; 144,606 ± 24,513] versus transient adhärenente Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [63,196 ± 14,600; 111,464 ± 18,313; 92,219 ± 13,895; 114,448 ± 20,189; 92,487 ± 6,501; 81,316 ± 12,705]).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Gruppe der adhärenenten Zellen macht erneut bei beiden Versuchsgruppen den geringsten Anteil aus (adhärente Zellen mit GPVI-aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [4,598 ± 4,598; 54,556 ± 8,128; 70,259 ± 14,076; 60,787 ± 7,751; 67,691 ± 10,102; 66,622 ± 10,179] versus adhärente Zellen mit GPVI-Fc und aCD133 [vor Ischämie; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min; 90 min nach Reperfusion]: [4,093 ± 4,093; 31,709 ± 11,096; 36,654 ± 8,396; 31,118 ± 9,487; 26,734 ± 5,891; 27,647 ± 7,230]).

Die Einzeldaten der Versuche des Ischämie-Reperfusionsmodells sind vollständig im Anhang zu finden.

Die *Abbildungen 45 bis 50* zeigen Bilder intravitalmikroskopischer Aufnahmen von Arteriolen und Venolen des Dünndarmes der Maus. Die Pfeile markieren beispielhaft adhärenente Zellen. Auf den beiden oberen Bildern vor Eintritt der Ischämie haften kaum fluoreszenzmarkierte Zellen. Bei den folgenden Aufnahmen, die nach Einsetzen der Reperfusion entstanden sind, adhärenieren bei Verwendung des Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 im Vergleich zu der Kontrollgruppe, bei der die Einzelkomponenten des Konstruktes eingesetzt wurden, deutlich mehr Zellen am Gefäßendothel.



Abbildung 45: GPVI-aCD133 vor Ischämie.

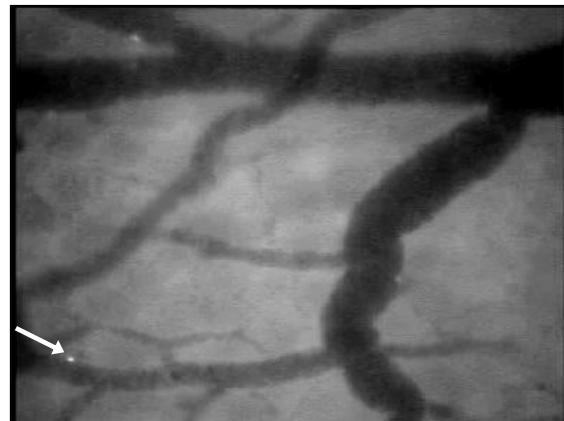


Abbildung 46: GPVI-Fc + aCD133 vor Ischämie.

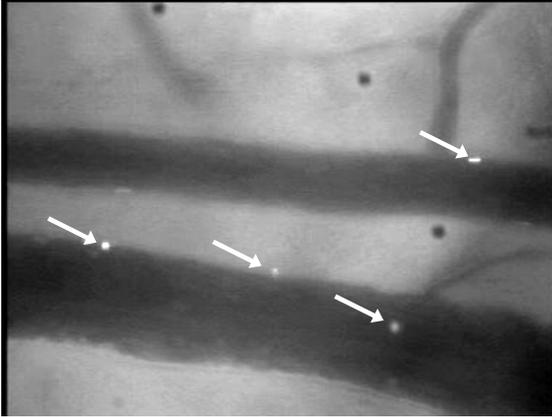


Abbildung 47: GPVI-aCD133 10 Minuten nach Reperfusion.

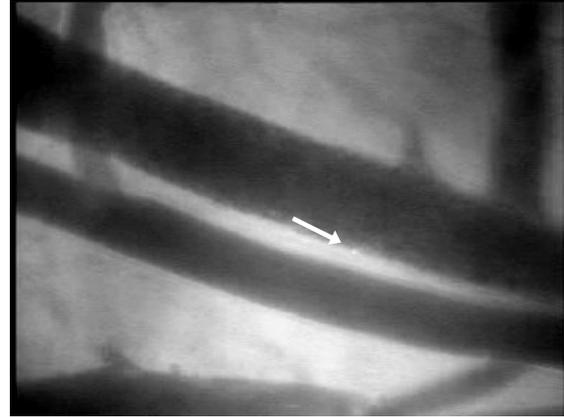


Abbildung 48: GPVI-Fc + aCD133 10 Minuten nach Reperfusion.

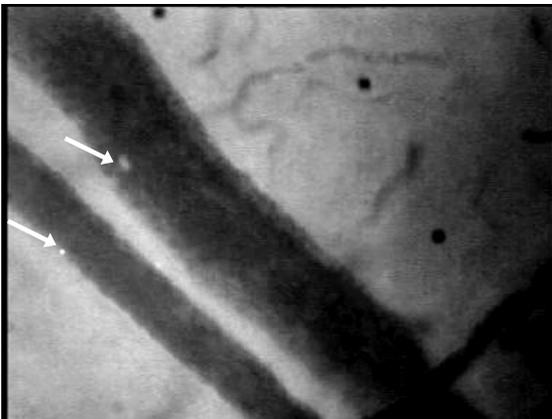


Abbildung 49: GPVI-aCD133 60 Minuten nach Reperfusion.

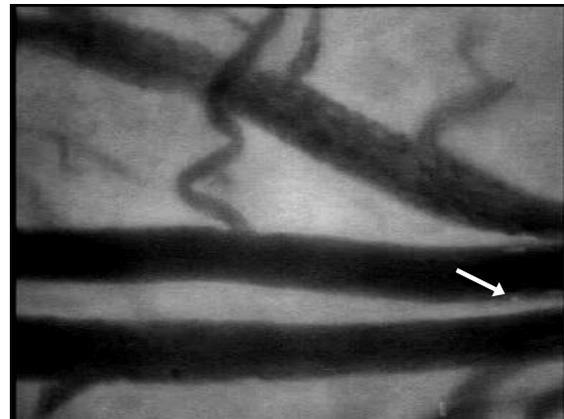


Abbildung 50: GPVI-Fc + aCD133 60 Minuten nach Reperfusion.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Das Mausmodell

Bei der Versuchsplanung stellt sich die Frage, an welchem Tiermodell die Untersuchungen vorgenommen werden sollen. Da in der vorliegenden Arbeit die Methode der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie angewendet wird, ist zu beachten, dass die Schichtdicke des durchdringenden Materials (technisch) limitiert ist. Bei der Maus ist die Gefäßwand dünn genug, um die Interaktionen der Zellen mit der Gefäßwand optisch darstellen zu können (LINDNER et al. 1993; MASSBERG et al. 1998a).

Weitere Vorteile bei der Wahl der Maus als Versuchstier sind die kurze Generationszeit, platzsparende Haltung und geringe Kosten für Haltung und Tiere sowie die einfache Handhabung. Hinzu kommt, dass der Verbrauch an Diagnostika und Therapeutika bei der Maus deutlich geringer ist als bei größeren Säugetieren. Außerdem bestehen die Möglichkeit der genetischen Manipulation zur Generierung verschiedener Knockout-Stämme sowie die Verfügbarkeit einer Vielzahl von monoklonalen Antikörpern (ZOLOTAREVA und KOGAN 1978; LINDNER et al. 1993; PAIGEN et al. 1994).

Für die intravitalemikroskopischen Untersuchungen werden in dieser Arbeit Wildtypmäuse C57BL/6J verwendet. Da die Tiere direkt nach der Intravitalemikroskopie getötet werden, entstehen keine Unverträglichkeiten aufgrund der verwendeten humanen Zellen. Falls jedoch zusätzlich Langzeitversuche mit humanen hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt werden sollen, sind immundefiziente Mäuse einzusetzen, um diese Problematik zu umgehen.

4.1.2 Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen

Gängige Therapiemethoden bei bestehender Atherosklerose mit ausgeprägter Lumenobstruktion sind die perkutane Katheterangioplastie mit Dilatation des betroffenen Gefäßabschnittes mittels Ballon oder Stentimplantation (LUSIS 2000).

Trotz kontinuierlicher Fortschritte in dieser Technologie, besteht die Gefahr der Restenosierung aufgrund einer Neointimabildung (WERNER et al. 2003; CHOI et al. 2004). Diesen Komplikationen wird mit Hilfe antithrombotischer Medikamente wie Aspirin[®] oder Clopidogrel[®] entgegen gewirkt (FUSTER et al. 1998; LIBBY 1998).

Schädigungen des Gefäßendothels, wie sie beispielsweise durch Ballonkatheterisierung oder Stentimplantation auftreten, führen zu einer freiliegenden extrazellulären Matrix. Dies löst über die Mechanismen der primären und sekundären Hämostase eine Thrombusbildung aus, infolge dessen es zu einem Gefäßverschluss kommen kann. Solange die Endothelialisierung des verletzten Gefäßendothels nicht abgeschlossen ist, herrscht in diesem Bereich eine thrombogene Situation. Um den Heilungsprozess zu beschleunigen, ist der Einsatz von hämatopoetischen Stammzellen denkbar. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass endotheliale Progenitorzellen eine entscheidende Rolle bei vaskulären Reparaturmechanismen spielen (ASAHARA et al. 1999; CARMELIET 2003; KAWAMOTO et al. 2003; WERNER et al. 2003; XU 2006). Neben der Adhäsion an Endothelschädigungen spielt auch ihre parakrine Wirkung eine Rolle. Endotheliale Progenitorzellen sezernieren zahlreiche angiogene Wachstumsfaktoren, die unterstützend auf die Funktion und Überlebensfähigkeit von reifen Endothelzellen einwirken und beispielsweise das Einwandern reifer Endothelzellen aus der Umgebung erleichtern (URBICH et al. 2005a; HRISTOV et al. 2007).

Diese Arbeit gliedert sich in eine Reihe von Projekten ein, die sich mit Adhäsionsprozessen und Differenzierungsvorgängen von Progenitorzellen befassen. Langer et al. haben gezeigt, dass Thrombozyten die Chemotaxis, Adhäsion und Differenzierung von T17b Zellen (mouse embryonic EPCs, eEPCs) steuern. Unter Flussbedingungen konnte dargestellt werden, dass murine eEPCs an adhärenente Thrombozyten binden. Außerdem war eine Differenzierung der murinen eEPCs in Endothelzellen bei Anwesenheit von Thrombozyten zu beobachten. Aufgrund dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass Thrombozyten wesentlich zu einer Rekrutierung von zirkulierenden murinen eEPCs an Läsionen der Gefäßwand beitragen (LANGER et al. 2006).

Daub et al. haben nachgewiesen, dass aktivierte humane Thrombozyten ebenfalls mit humanen CD34⁺ Progenitorzellen interagieren, wobei P-Selektin für den Prozess des Rollens verantwortlich ist, die feste Adhäsion an adhärenente Thrombozyten hingegen durch

die β_1 - und β_2 -Integrine der Progenitorzellen vermittelt wird (DAUB et al. 2006; LANGER et al. 2006).

Neuere Untersuchungen von Massberg et al. konnten mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie an einem Verletzungsmodell der Arteria carotis der Maus zeigen, dass Thrombozyten am Rekrutierungsprozess endogener Progenitorzellen maßgeblich beteiligt sind (MASSBERG et al. 2006). Demnach sind Thrombozyten, welche nach einer Gefäßschädigung als erstes an das freiliegende Subendothel adhären, sowohl an der Blutstillung als auch an der Rekrutierung von Progenitorzellen an Endothelschädigungen und exponiertes Kollagen beteiligt.

4.1.3 Einsatz des Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133

Um eine rasche Endothelialisierung zu erreichen, ist es entscheidend, eine möglichst große Anzahl hämatopoetischer Progenitorzellen an die Gewebeschädigung zu dirigieren. Daher wird nach neuen Möglichkeiten gesucht, dieses Ziel zu erreichen. In einigen Studien werden bispezifische Antikörper eingesetzt, um gezielt hämatopoetische Stammzellen an geschädigtes Myokard zu lenken (LUM et al. 2004; LEE et al. 2007). Diese Strategie nutzt die Vorteile bispezifischer Antikörper, einerseits Stammzellen und andererseits Adhäsionsmoleküle, die auf den geschädigten Zellen exprimiert werden, binden zu können (LUM et al. 2004). Auf diese Weise werden mit bispezifischen Antikörpern gerüstete Stammzellen eingesetzt, die mit Hilfe dieser bispezifischen Antikörper an die entsprechenden Strukturen gelenkt werden. Da diese bispezifischen Antikörper jedoch nur auf bestimmte Strukturen ausgerichtet sind, und es eine Vielzahl von Bindungspartnern gibt, besteht die Schwierigkeit darin, eine geeignete Struktur zu finden, die eine erhöhte Adhäsion von hämatopoetischen Stammzellen verspricht und in möglichst vielen Geweben vorhanden ist.

In der vorliegenden Arbeit wird das bispezifische Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 eingesetzt, das aus dem löslichen thrombozytären Glykoprotein VI und einem Antikörper gegen den auf hämatopoetischen Stammzellen auftretenden Marker CD133 besteht. Es wird untersucht, ob es durch den Einsatz dieses Adhäsionsmoleküls möglich ist, vermehrt Progenitorzellen an Endothelläsionen zu rekrutieren und somit zu einer beschleunigten Endothelialisierung beizutragen. Die Bedeutung des Thrombozytenoberflächenrezeptors Glykoprotein VI für die Thrombozytenaktivierung sowie für Adhäsionsprozesse ist bereits

durch zahlreiche Untersuchungen belegt (WATSON und GIBBINS 1998; NIESWANDT et al. 2001a; MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b; NIESWANDT und WATSON 2003).

4.1.4 Charakterisierung der Zellinteraktionen mit der Gefäßwand mittels Intravitalmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wird die Methode der Intravitalmikroskopie zur optischen Darstellung von Zellinteraktionen mit dem Gefäßendothel eingesetzt. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine gängige Methode zur Untersuchung des Blutflusses und wird bereits in verschiedenen Organsystemen angewendet (MENGER und LEHR 1993; GONZALEZ et al. 1994; FRENETTE et al. 1995; FRENETTE et al. 1998; MASSBERG et al. 1998; ERIKSSON et al. 2000; VAJKOCZY et al. 2000; VOLLMAR et al. 2000; BECKER et al. 2001; GRAYSON et al. 2001; KOSEKI et al. 2001; READ et al. 2001; VOLLMAR et al. 2001; EICHHORN et al. 2002). Von Vorteil bei dieser Methode ist die direkte Visualisierung von sowohl physiologischen als auch pathologischen hämodynamischen Vorgängen am lebenden Tier. Um diese komplexen Vorgänge untersuchen zu können, reichen *ex vivo* Versuche in den meisten Fällen nicht aus. Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff DCF findet in der Literatur vielfach Verwendung (KOSEKI et al. 2001; MASSBERG et al. 2002; MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b; MASSBERG et al. 2006).

Die Einteilung der fluoreszenzmarkierten Zellen nach der Art der Interaktion, die sie mit dem Gefäßendothel eingehen, ist in der Literatur beschrieben (GONZALEZ et al. 1994; MASSBERG et al. 1998a; MASSBERG et al. 1998b; EICHHORN et al. 2002). Es wird zwischen sich frei bewegenden Zellen, rollenden und adhären Zellen unterschieden. Der Prozess des Rollens ist dabei dahingehend definiert, dass die Geschwindigkeit der rollenden Zellen langsamer als der Blutfluss an sich sein muss. Über die Anzahl an Sekunden, die eine Zelle haften muss, bis sie in die Gruppe der adhären Zellen eingestuft werden kann, gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben, die von 5 Sekunden bis 30 Sekunden reichen (GONZALEZ et al. 1994; MASSBERG et al. 1998a; MASSBERG et al. 1998b; EICHHORN et al. 2002). Neben der Unterscheidung in rollende und adhären Zellen wird in der vorliegenden Arbeit die Gruppe der adhären Zellen in transient adhären Zellen, die weniger als 15 Sekunden haften und in fest adhären Zellen

Zellen, die länger als 15 Sekunden an derselben Stelle des Gefäßendothels haften, gegliedert.

Da in Makro- und Mikrozirkulation unterschiedliche Scherkräfte herrschen, werden in dieser Arbeit zwei Verletzungsmodelle mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht. Für die Makrozirkulation wird ein ligaturinduziertes Verletzungsmodell der A. carotis communis der Maus herangezogen und für die Mikrozirkulation ein Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm der Maus. So ist auch ein Vergleich beider Systeme und der Art der Verletzung im Hinblick auf die Adhäsion von Progenitorzellen möglich.

Im Blutkreislauf herrscht eine weitgehend laminare Strömung mit einem parabolischen Geschwindigkeitsprofil. Unter physiologischen Bedingungen können bei hohen Fließgeschwindigkeiten in großen Gefäßen Turbulenzen auftreten. Turbulenzen treten außerdem unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei Gefäßstenosen oder Herzklappenfehlern auf (KUSCHINSKY 1999). Die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes ist in den großen arteriellen Gefäßen wie der A. carotis communis hoch und im Bereich der Kapillaren niedrig (KUSCHINSKY 1999). In den Venolen als postkapillären Gefäßen ist der Blutdruck noch geringer als in den präkapillären Arteriolen.

4.1.5 Schwierigkeiten bei der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Versuchsdurchführung ergeben sich einige Schwierigkeiten. Da die Versuche vor allem im Darmmodell durch die einstündige Ischämiephase sowie die Aufnahmen bis 90 Minuten nach erfolgter Reperfusion einige Zeit in Anspruch nehmen, ist bei einzelnen Tieren die Kreislaufsituation schlecht. Der Blutfluss sistiert oder kommt erst spät in Gang, so dass keine Aufnahmen zeitnah zur Reperfusion möglich sind. Selten kommt dies auch bei Tieren im Carotismodell vor. Dadurch, dass der Blutfluss im Ischämie-Reperusionsmodell verzögert einsetzt, werden intravitalmikroskopische Aufnahmen im Vergleich zum Carotismodell bis 90 Minuten nach Reperfusion durchgeführt.

Des Weiteren führt eine vermehrte Darmperistaltik zu undeutlichen Aufnahmen. Indem die Befeuchtung des Darmes mit geänderter Wassertemperatur erfolgt und die Wärmematte einige Minuten ausgeschaltet wird, kann in den meisten Fällen die Peristaltik eingedämmt werden. Bei den Tieren, die im Carotismodell eingesetzt werden, kann es durch zu starken Zug während der Ligatur in der Reperfusion zu einer Thrombusbildung kommen. Diese Thrombusbildung kann im Einzelfall so stark ausgeprägt sein, dass der Blutfluss sistiert.

Tiere, bei denen die genannten Schwierigkeiten auftreten, werden nicht in die Auswertung mit einbezogen, da in diesen Fällen keine beurteilbaren Aufnahmen möglich sind.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Allgemeine Beobachtungen

Ein Vergleich der Gruppe humane Endothelzellen / humane CD34⁺ Progenitorzellen mit der Gruppe CD34⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 / GPVI-Fc und aCD133 wird nicht durchgeführt. Die Versuche mit humanen Endothelzellen und CD34⁺ Progenitorzellen dienen als Vorversuche, um einen allgemeinen Überblick zu erhalten, ob die Zellen Kontakt mit dem Endothel aufnehmen. Da die Vorversuche und die Versuche mit Verwendung des Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 zeitlich einige Monate auseinander liegen, kommt eine andere Zellcharge von CD34⁺ Progenitorzellen zum Einsatz.

Pro Versuchstag werden zwei Versuche durchgeführt. Die dafür benötigte Menge an CD34⁺ Progenitorzellen wird vorbereitet und die Zellmenge für eine Maus mit dem GPVI-aCD133 Konstrukt vorinkubiert und die Zellmenge für die zweite Maus mit den Einzelkomponenten des Konstruktes als Kontrolle vorinkubiert. Daher ist ein Vergleich innerhalb der Gruppe sinnvoll, da die gleichen Zellen vorbereitet und eingesetzt werden. Außerdem werden Wildtypmäuse aus einer Bestellgruppe für die Versuche verwendet.

4.2.2 Ergebnisse aus dem Carotismodell

4.2.2.1 Vergleich humaner Endothelzellen mit humanen CD34⁺ Progenitorzellen im Carotismodell

Bei einem Vergleich der drei Schaubilder in *Abbildung 21, 22 und 23* wird deutlich, dass weitaus mehr humane CD34⁺ Progenitorzellen eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, als es bei humanen Endothelzellen der Fall ist. Bei humanen Endothelzellen handelt es sich um bereits ausdifferenzierte Zellen mit geringem Proliferationspotential, deren Fähigkeit, geschädigtes Endothel zu ersetzen, stark begrenzt ist (ASAHARA et al. 1997; PEICHEV et al. 2000; HRISTOV und WEBER 2004). CD34⁺ Progenitorzellen weisen bestimmte Oberflächenrezeptoren auf, die sich mit zunehmender Differenzierung verlieren (PEICHEV et al. 2000). Außerdem exprimieren sie unterschiedliche

Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Selektine, die die Interaktionen mit dem Gefäßendothel vermitteln (DAUB et al. 2006; LANGER et al. 2006; HRISTOV et al. 2007). Endotheliale Vorläuferzellen verlieren allmählich ihre Progenitorzeleigenschaften und beginnen mit der Expression von endothelialen Markern wie vWF und VE-Cadherin (HRISTOV und WEBER 2004).

Dabei ist die Anzahl der transienten Zellen pro mm² Gefäßendothel sowohl bei den humanen Endothelzellen als auch bei den humanen CD34⁺ Progenitorzellen doppelt so hoch wie bei den adhärennten Zellen beider Zelltypen. Sowohl in der Gruppe der humanen Endothelzellen als auch der humanen CD34⁺ Progenitorzellen sind kaum rollende Zellen vorhanden.

4.2.2.2 Vergleich der Versuche mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 mit der Kontrollgruppe

In den Schaubildern in *Abbildung 24, 25 und 26* liegt die blaue Kurve, die die CD34⁺ Progenitorzellen mit dem Konstrukt darstellt, deutlich über der Kontrollkurve. Das bedeutet, dass unter Verwendung des Konstruktes weitaus mehr Zellen eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, als dies bei der Kontrollgruppe der Fall ist. Obwohl nicht alle untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufweisen, ist dennoch eine eindeutige Tendenz ersichtlich.

4.2.3 Ergebnisse aus dem Darmmodell

4.2.3.1 Vergleich humaner Endothelzellen mit humanen CD34⁺ Progenitorzellen in Arteriolen und Venolen

Bei einem Vergleich der Schaubilder der Arteriolen in *Abbildung 33, 34 und 35* ist erkennbar, dass die Anzahl der CD34⁺ Progenitorzellen sowohl bei den rollenden als auch den adhärennten Zellen nur gering über der Anzahl an humanen Endothelzellen liegt. Bei den transient adhärennten Zellen hingegen liegt die Kurve der CD34⁺ Progenitorzellen deutlich über der Kurve der humanen Endothelzellen.

In den Schaubildern der Venolen in *Abbildung 36, 37 und 38* ist kaum ein Unterschied zwischen humanen Endothelzellen und CD34⁺ Progenitorzellen zu erkennen, da die Kurven in den einzelnen Schaubildern nahezu deckungsgleich erscheinen. Die Kurve der

humanen Endothelzellen ist jedoch im Schaubild der rollenden Zellen leicht oberhalb der Kurve, die die CD34⁺ Progenitorzellen darstellt, gelegen und stellt somit einen Einzelfall im Vergleich zu den übrigen Schaubildern dar.

Auffällig ist, dass in den Arteriolen sowohl bei den humanen Endothelzellen, als auch bei den humanen CD34⁺ Progenitorzellen deutlich weniger Zellen eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen als in den Venolen, was darauf zurückzuführen ist, dass der Blutstrom in den Arteriolen eine höhere Geschwindigkeit als in den Venolen aufweist. Außerdem ist der Druck in den präkapillären Gefäßen (Arteriolen) höher als in den postkapillären Venolen.

4.2.3.2 Vergleich der Versuche mit dem Adhäsionsmolekül mit der Kontrollgruppe in den Arteriolen und Venolen des Dünndarmes

Bei einem Vergleich der Schaubilder der Arteriolen wird deutlich, dass unter Verwendung des Konstruktes deutlich mehr Zellen eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, was an den blauen Kurven in den drei Schaubildern der *Abbildung 39, 40 und 41* sichtbar ist, als dies bei der Kontrollgruppe der Fall ist. Bei einigen Zeitpunkten ist der Unterschied zwischen Konstrukt- und Kontrollgruppe jedoch deutlicher ausgeprägt als bei anderen.

Anhand der Schaubilder der Venolen in *Abbildung 42, 43 und 44* ist der Unterschied zwischen Zellen, die mit dem Konstrukt vorinkubiert wurden, und der Kontrollgruppe noch deutlicher erkennbar. Außerdem stellen sich die Kurven auf alle Zeitpunkte bezogen gleichmäßiger dar, als bei den Schaubildern der Arteriolen. Obwohl auch hier nicht bei allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede vorliegen, ist eine deutliche Tendenz erkennbar, dass der Einsatz des Konstruktes GPVI-aCD133 eine vermehrte Adhäsion von CD34⁺ Progenitorzellen zur Folge hat.

4.2.4 Vergleich der beiden Verletzungsmodelle

Bei der Auswertung der Versuche aus dem Carotismodell ist auffällig, dass kaum rollende Zellen vorhanden sind. Im Darmmodell stellen die rollenden Zellen jedoch den größten Anteil an Zellen dar, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen. Dadurch, dass in großen Gefäßen wie der Arteria carotis die Geschwindigkeit des Blutflusses höher ist als in Arteriolen und Venolen des Dünndarmes, ist der Prozess des Rollens vermehrt in den langsam fließenderen Gefäßabschnitten zu finden. Erwähnenswert ist zudem, dass bei allen

DISKUSSION

drei Anhaftungsarten in den Venolen deutlich mehr Zellen eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen als in den Arteriolen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Verletzungsmodellen ist die absolute Anzahl an Zellen pro mm² Gefäßendothel. Aufgrund der einstündigen Ischämiephase im Darmmodell sind die eingesetzten Zellen bereits häufig im Kreislauf zirkuliert und zum Teil in unterschiedlichen Gefäßen sowie in verschiedenen Organen wie beispielsweise der Milz (GRAYSON et al. 2001; TEMPLIN et al. 2006) haften geblieben. Im Carotismodell dagegen findet eine 5-minütige Ligatur statt, bevor die Aufnahmen erfolgen. In dieser vergleichsweise kurzen Zeit sind noch die meisten Zellen im Blutvolumen anzutreffen.

Eine Erklärung für die abweichende Anzahl an Zellen, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, könnte auch die unterschiedliche Art der Verletzung in den beiden Mausmodellen sein. Im Carotismodell wird die Verletzung mechanisch durch eine Ligatur erzielt. In diesem verletzten Gefäßabschnitt finden auch die intravitalmikroskopischen Aufnahmen statt. Bei den Versuchen im Darmmodell wird die Verletzung indirekt durch eine induzierte Ischämie hervorgerufen. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen finden im Bereich des ischämisch geschädigten und im Anschluss reperfundierten Gewebes statt und nicht direkt an der Stelle, an der die Blutzufuhr mittels Ligatur unterbunden wurde.

Die mechanische Verletzung im ligaturinduzierten Carotismodell hat eine freiliegende extrazelluläre Matrix zur Folge (MASSBERG et al. 2003a; MASSBERG et al. 2003b), wobei der Verlust der Endothelzellbarriere zwischen Strukturen der extrazellulären Matrix und dem Blutfluss einen Auslösemechanismus der Hämostase darstellt (RUGGERI 2002). Beim Darmmodell unterliegt das Endothel einer funktionellen Störung durch die postischämische Reperfusion und geht in einen prothrombotischen Zustand über (BECKER et al. 2000) (siehe auch Kapitel 2.1.3.). Das aktivierte Endothel entwickelt adhäsionsvermittelnde Eigenschaften (SIEGEL-AXEL et al. 2006) und zahlreiche Rezeptoren wie P-Selektin, vWF und ICAM-1 werden exprimiert (BECKER et al. 2000). Es ist ersichtlich, dass im Carotismodell eine stärkere Schädigung am Gefäßendothel erzielt wird und dadurch auch insgesamt gesehen die Anzahl an Zellen, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, deutlich höher ist, als bei der indirekten Schädigung durch den Ischämie-Reperfusionprozess im Darmmodell.

Eine Gemeinsamkeit beider Modelle stellt der Anteil adhärenter Zellen pro mm² Gefäßendothel dar, der jeweils die am wenigsten vertretene Anhaftungsart ausmacht. Die Kontaktaufnahme der Zelle mit dem Gefäßendothel besteht aus mehreren Stufen. Zuerst findet das tethering als erster loser Kontakt statt, gefolgt vom Prozess des Rollens, der über P-Selektin/PSGL-1 vermittelt wird. Die feste Adhäsion hingegen wird über β -Integrine vermittelt (GAWAZ et al. 2005b). Da für die feste Adhäsion mehrere Mechanismen nacheinander ablaufen müssen, wird klar, dass viele Zellen solange der Kontakt noch lose ist, vorher abgeschwemmt werden, bevor eine feste Adhäsion eintritt. Dies erklärt, weshalb adhärente Zellen die am wenigsten vertretene Anhaftungsart ausmachen.

4.2.5 Homing der CD34⁺ Progenitorzellen

Mehrere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben sich mit dem Homing von hämatopoetischen Progenitorzellen beschäftigt, wobei vor allem die Rekrutierung dieser Zellen als Voraussetzung für spätere Adhäsionsprozesse Gegenstand der Untersuchungen war. Langer et al. haben nachgewiesen, dass adhärenente Thrombozyten an der Rekrutierung und Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen (Zelllinie T17b) *in vitro* beteiligt sind (LANGER et al. 2006). Desweiteren konnten Massberg et al. auch *in vivo* zeigen, dass der von Thrombozyten sezernierte stromal cell derived factor 1 α (SDF-1 α) für die Rekrutierung von humanen hämatopoetischen Progenitorzellen an Endothelläsionen eine entscheidende Rolle spielt (MASSBERG et al. 2006).

Die Verwendung unterschiedlicher bispezifischer Antikörper mit dem Ziel, das homing hämatopoetischer Stammzellen zu verbessern, ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (LUM et al. 2004; LEE et al. 2007). Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte rekombinante Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 zeigt in beiden Verletzungsmodellen der Maus eine Steigerung der Adhäsion hämatopoetischer CD34⁺ Progenitorzellen an geschädigtes Endothel und ist daher ein weiteres Indiz dafür, diese neuen Ansätze weiter zu verfolgen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die frühzeitige Wiederherstellung einer intakten Endothelzellschicht nach einer Gefäßwandverletzung trägt zur Prävention einer Thrombusbildung und Neointimaproliferation bei. Nachdem zirkulierende endotheliale Progenitorzellen als wichtiger Faktor für die Reendothelialisierung entdeckt worden sind, können endotheliale Progenitorzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in reife Endothelzellen zu differenzieren, dazu dienen, thrombogene Strukturen abzudecken und eine intakte Endothelzellschicht zu bilden.

Im Anschluss an vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe kann die vorliegende Arbeit mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie anhand zweier verschiedener Verletzungsmodelle der Maus zeigen, dass die Verwendung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 eine vermehrte Adhäsion von CD34⁺ Progenitorzellen zur Folge hat. Als Vorversuche dienen humane Endothelzellen sowie humane CD34⁺ Progenitorzellen, um das Verhalten der Zellen *in vivo* darzustellen und beurteilen zu können. Obwohl diese Studie nicht im Bereich der Präventivmedizin angesiedelt ist, kommt sie jedoch bei bereits geschädigtem Gewebe zum Tragen. Indem die Adhäsion an geschädigte Gefäßareale durch die Verwendung dieses Konstruktes erhöht werden kann, besteht die Aussicht auf einen beschleunigten Heilungsprozess und somit ein intaktes Gefäßendothel.

Des Weiteren ist über eine Verbesserung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls dahingehend nachzudenken, statt der Fusion zweier Proteine ein rekombinantes Protein zu entwickeln. Dies bietet den Vorteil einer stabilen Zelllinie, außerdem ist dadurch eine höhere Ausbeute an Protein sowie eine hochreine Produktion möglich.

Als weiterer Schritt bleibt in Langzeitversuchen mit immundefizienten Mäusen abzuklären, wie sich die CD34⁺ Progenitorzellen weiter entwickeln und in welchem Maße mit einer Differenzierung in Endothelzellen zu rechnen ist. Bevor an einen therapeutischen Einsatz am Menschen gedacht werden kann, sind zudem umfassende Untersuchungen im Bereich der Histologie und Immunhistochemie sowie Langzeitversuche und höhere Tierzahlen erforderlich. Möglicherweise resultieren aus diesen Erkenntnissen neue Angriffspunkte für medikamentöses Eingreifen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Endothelschädigungen, wie sie auch im Rahmen der Angioplastie auftreten können, führen aufgrund einer freiliegenden extrazellulären Matrix zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade mit anschließender Thrombusbildung. Dieser thrombogene Zustand hält solange an, bis eine erneute Endothelialisierung dieses Gefäßabschnittes stattgefunden hat. Daher wird nach Möglichkeiten gesucht, die Endothelialisierung zu beschleunigen, und somit wieder einen antithrombogenen Zustand zu schaffen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie im Mausmodell eingesetzt, um die Interaktionen der hämatopoetischen CD34⁺ Progenitorzellen mit der Gefäßwand optisch darstellen und auswerten zu können. Die Untersuchungen erfolgten an zwei verschiedenen Mausmodellen: zum einen an einem ligaturinduzierten Verletzungsmodell an der Arteria carotis der Maus und zum anderen an einem Ischämie-Reperusionsmodell am Dünndarm der Maus. In beiden Verletzungsmodellen wurden humane Endothelzellen im Vergleich zu CD34⁺ Progenitorzellen verwendet. Im weiteren Versuchsablauf wurden CD34⁺ Progenitorzellen mit dem bispezifischen Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133, welches aus dem löslichen thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI und einem Antikörper gegen den Stammzellmarker CD133 besteht, vorinkubiert um zu ermitteln, ob dadurch eine vermehrte Adhäsion erreicht werden kann.

In beiden Mausmodellen gelang der Nachweis, dass sich die Anzahl hämatopoetischer Stammzellen, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, unter Verwendung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 verglichen mit dem Einsatz der Einzelkomponenten erhöht. Aufgrund der vermehrten Adhäsion hämatopoetischer Stammzellen an geschädigtes Gefäßendothel könnte der Einsatz dieses Adhäsionsmoleküls eine Möglichkeit darstellen, die Endothelialisierung zu beschleunigen und somit Grundlage neuer therapeutischer Strategien sein.

6 SUMMARY

The influence of the adhesion molecule GPVI-aCD133 on hematopoietic progenitor cell adhesion in two different mouse models

Vascular lesions, for example caused by angioplasty, lead to exposed extracellular matrix. As a consequence thrombus formation is following. These thrombogenic conditions exist until endothelialization has happened. Therefore it's important to find out new options for an accelerated endothelialization to restore vascular integrity and an antithrombotic situation.

In this study intravital fluorescent microscopy was used in a mouse model to show interactions between hematopoietic CD34⁺ progenitor cells and the endothelium. Two different mouse models were used: a mouse carotid artery injury model and an ischemia/reperfusion model in small intestine. In both injury models human endothelial cells were compared with CD34⁺ progenitor cells. Furthermore CD34⁺ progenitor cells incubated with the GPVI-aCD133 construct, which consists of the soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI and an antibody to CD133, were used to examine the enhancement of cell adhesion.

In both mouse models it was possible to recruit CD34⁺ progenitor cells to sites of vascular lesions. While using the GPVI-aCD133 construct there was an increase in cell-endothelium interaction compared to the single components of the construct as control. Because of the increased adhesion of hematopoietic progenitor cells at vascular injury sites this bispecific adhesion molecule represents an option for an accelerated endothelialization and could be a possibility for new therapeutic strategies.

7 ANHANG

7.1 Daten des Carotismodells

7.1.1 Verwendung von humanen Endothelzellen (hEC)

vor Ligatur									
Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1 re	17,375	14,363	5,947	0,000	0,000	0,000	0,000	7,136	3,304
Nr. 1 li	17,303			0,000			17,303		
Nr. 2 re	17,203			0,000			0,000		
Nr. 2 li	0,000			0,000			34,223		
Nr. 3 re	0,000			0,000			0,000		
Nr. 3 li	69,248			0,000			0,000		
Nr. 4 re	0,000			0,000			0,000		
Nr. 4 li	0,000			0,000			0,000		
Nr. 5 re	17,252			0,000			0,000		
Nr. 5 li	33,981			0,000			16,991		
Nr. 6 re	0,000			0,000			0,000		
Nr. 6 li	0,000			0,000			17,111		

5 Min. nach Ligatur									
Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1 re	555,985	406,242	57,724	0,000	3,669	2,492	590,734	223,733	43,085
Nr. 1 li	622,904			0,000			294,149		
Nr. 2 re	756,913			0,000			172,026		
Nr. 2 li									
Nr. 3 re	225,869			0,000			156,371		
Nr. 3 li	461,654			23,083			276,992		
Nr. 4 re	181,706			0,000			113,566		
Nr. 4 li	224,814			0,000			86,467		
Nr. 5 re	276,025			0,000			224,271		
Nr. 5 li	543,701			0,000			288,841		
Nr. 6 re	328,193			17,273			103,640		
Nr. 6 li	290,893			0,000			154,002		

ANHANG

10 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1 re	469,112	434,986	36,383	0,000	2,891	1,949	608,109	278,762	38,306
Nr. 1 li	622,904			0,000			449,875		
Nr. 2 re	653,697			0,000			258,038		
Nr. 2 li	530,452			0,000			290,893		
Nr. 3 re	416,989			17,375			225,869		
Nr. 3 li	519,361			17,312			259,680		
Nr. 4 re	425,873			0,000			323,663		
Nr. 4 li	363,161			0,000			224,814		
Nr. 5 re	322,030			0,000			230,021		
Nr. 5 li	288,841			0,000			135,925		
Nr. 6 re	299,404			0,000			184,249		
Nr. 6 li	308,004			0,000			154,002		

30 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1 re	642,858	474,559	51,837	0,000	0,000	0,000	260,618	248,032	28,962
Nr. 1 li	484,481			0,000			397,966		
Nr. 2 re	688,102			0,000			292,444		
Nr. 2 li	462,007			0,000			273,782		
Nr. 3 re	451,738			0,000			243,243		
Nr. 3 li									
Nr. 4 re									
Nr. 4 li	501,508			0,000			224,814		
Nr. 5 re									
Nr. 5 li	254,860			0,000			135,925		
Nr. 6 re	310,919			0,000			155,460		
Nr. 6 li									

ANHANG

7.1.2 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen

vor Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1b re	68,699	37,549	12,206	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nr. 1b li	17,175			0,000			0,000		
Nr. 2b re	17,203			0,000			0,000		
Nr. 2b li	0,000			0,000			0,000		
Nr. 1 re	52,449			0,000			0,000		
Nr. 1 li	69,769			0,000			0,000		

5 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1b re	1339,634	1256,349	66,848	0,000	0,000	0,000	790,041	634,315	39,788
Nr. 1b li	1305,284			0,000			618,293		
Nr. 2b re	1192,711			0,000			550,482		
Nr. 2b li	1465,582			0,000			572,493		
Nr. 1 re	979,041			0,000			559,452		
Nr. 1 li	1255,839			0,000			715,131		

10 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1b re	1459,858	1289,141	54,995	0,000	0,000	0,000	618,293	609,050	37,535
Nr. 1b li	1322,459			0,000			583,943		
Nr. 2b re									
Nr. 2b li	1253,760			0,000			480,894		
Nr. 1 re	1118,904			0,000			699,315		
Nr. 1 li	1290,724			0,000			662,804		

30 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1b re	978,963	1069,575	63,709	0,000	0,000	0,000	566,768	442,424	46,162
Nr. 1b li	961,788			0,000			343,496		
Nr. 2b re	1100,964			0,000			430,064		
Nr. 2b li	1236,585			0,000			429,370		
Nr. 1 re									
Nr. 1 li									

60 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1b re	807,215	871,961	59,594	0,000	0,000	0,000	463,719	365,089	43,945
Nr. 1b li	1047,662			0,000			412,195		
Nr. 2b re	842,926			0,000			309,646		
Nr. 2b li	790,041			0,000			274,797		
Nr. 1 re									
Nr. 1 li									

ANHANG

7.1.3 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen, die mit GPVI-aCD133 vorinkubiert wurden

vor Ligatur									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 2 li	117,033	195,764	41,959	83,595	66,720	27,571	0,000	5,820	4,113
Nr. 5 re	175,025			35,005			17,503		
Nr. 5 li	488,249			69,750			34,875		
Nr. 9 re	119,779			0,000			0,000		
Nr. 9 li	256,670			256,670			0,000		
Nr. 12 re	260,182			0,000			0,000		
Nr. 12 li	137,620			34,405			0,000		
Nr. 1b re	86,258			0,000			0,000		
Nr. 1b li	121,054			121,054			0,000		

5 Min. nach Ligatur									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 2 li	819,234	897,503	53,511	16,719	38,147	15,050	167,191	483,852	92,111
Nr. 5 re	746,774			0,000			280,040		
Nr. 5 li	871,874			52,312			348,749		
Nr. 9 re	1043,792			136,891			1112,238		
Nr. 9 li	1072,311			68,445			684,454		
Nr. 12 re	676,473			17,345			416,291		
Nr. 12 li	774,115			51,608			412,861		
Nr. 1b re	931,586			0,000			414,038		
Nr. 1b li	1141,364			0,000			518,802		

10 Min. nach Ligatur									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 2 li	902,830	963,075	42,617	0,000	19,761	9,221	317,662	571,242	80,915
Nr. 5 re	927,633			17,503			455,065		
Nr. 5 li	854,436			17,437			401,062		
Nr. 9 re	975,347			85,557			1163,572		
Nr. 9 li	838,456			34,223			650,231		
Nr. 12 re	948,218			23,127			578,182		
Nr. 12 li	894,533			0,000			516,077		
Nr. 1b re	1081,100			0,000			552,051		
Nr. 1b li	1245,124			0,000			507,273		

ANHANG

30 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 2 li		970,772	20,961		28,727	16,348		499,073	62,219
Nr. 5 re	927,633			35,005			647,593		
Nr. 5 li									
Nr. 9 re	906,902			102,668			290,893		
Nr. 9 li									
Nr. 12 re	1023,382			34,691			676,473		
Nr. 12 li	1032,154			0,000			550,482		
Nr. 1b re	948,838			0,000			448,541		
Nr. 1b li	985,723			0,000			380,455		

60 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 2 li		888,063	72,599		4,625	4,625		358,741	56,758
Nr. 5 re									
Nr. 5 li									
Nr. 9 re	661,639			0,000			182,521		
Nr. 9 li	912,605			0,000			342,227		
Nr. 12 re	1017,600			23,127			508,800		
Nr. 12 li									
Nr. 1b re	793,573			0,000			310,529		
Nr. 1b li	1054,897			0,000			449,628		

7.1.4 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen, die mit GPVI-Fc und aCD133 vorinkubiert wurden

vor Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 6 re	34,405	80,126	33,259	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nr. 6 li	0,000			0,000			0,000		
Nr. 10 re	155,964			0,000			0,000		
Nr. 10 li	17,252			0,000			0,000		
Nr. 11 re	225,869			0,000			0,000		
Nr. 11 li	190,227			0,000			0,000		
Nr. 1b re	0,000			0,000			0,000		
Nr. 1b li	17,293			0,000			0,000		

ANHANG

5 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 6 re	154,823	775,784	120,653	0,000	7,195	4,833	0,000	240,017	65,531
Nr. 6 li	518,291			0,000			117,033		
Nr. 10 re	883,796			0,000			86,647		
Nr. 10 li	966,089			34,503			396,787		
Nr. 11 re	573,360			0,000			191,120		
Nr. 11 li	830,083			23,058			184,463		
Nr. 1b re	1196,110			0,000			529,049		
Nr. 1b li	1083,719			0,000			415,041		

10 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 6 re	326,849	713,321	88,114	0,000	7,405	5,134	17,203	206,799	45,833
Nr. 6 li	652,044			0,000			150,472		
Nr. 10 re	901,126			17,329			207,952		
Nr. 10 li	931,586			34,503			327,780		
Nr. 11 re	573,360			0,000			121,622		
Nr. 11 li	639,856			0,000			259,401		
Nr. 1b re									
Nr. 1b li	968,430			0,000			363,161		

30 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 6 re	361,254	754,486	118,727	0,000	2,875	2,875	206,431	328,118	62,950
Nr. 6 li									
Nr. 10 re									
Nr. 10 li	931,586			17,252			569,303		
Nr. 11 re	573,360			0,000			138,996		
Nr. 11 li	570,682			0,000			276,694		
Nr. 1b re	1017,844			0,000			379,535		
Nr. 1b li	1072,190			0,000			397,748		

60 Min. nach Ligatur

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 6 re		612,924	111,442		5,776	5,776		265,198	57,819
Nr. 6 li									
Nr. 10 re	970,443			34,659			467,892		
Nr. 10 li	874,081			0,000			414,038		
Nr. 11 re	277,993			0,000			138,996		
Nr. 11 li	363,161			0,000			155,641		
Nr. 1b re	569,303			0,000			172,516		
Nr. 1b li	622,562			0,000			242,108		

ANHANG

7.2 Daten des Darmmodells - Arteriolen

7.2.1 Verwendung von humanen Endothelzellen (hEC)

vor Ischämie									
Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	24,252	13,726	5,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	22,736			0,000			0,000		
Nr. 3	8,842			0,000			0,000		
Nr. 4	26,526			0,000			0,000		
Nr. 5	0,000			0,000			0,000		
Nr. 6	0,000			0,000			0,000		

5 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	0,000	19,768	10,044	52,344	35,755	24,602	21,221	3,537	3,537
Nr. 2	8,842			0,000			0,000		
Nr. 3	65,683			151,576			0,000		
Nr. 4	20,210			0,000			0,000		
Nr. 5	23,873			10,610			0,000		
Nr. 6	0,000			0,000			0,000		

10 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	10,610	26,764	14,919	21,221	56,406	25,919	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	0,000			49,515			0,000		
Nr. 3	95,746			149,808			0,000		
Nr. 4	37,726			117,893			0,000		
Nr. 5	16,505			0,000			0,000		
Nr. 6	0,000			0,000			0,000		

30 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	29,709	16,534	7,681	16,977	53,551	29,880	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	8,488			110,819			0,000		
Nr. 3	13,263			0,000			0,000		
Nr. 4	0,000			176,839			0,000		
Nr. 5	0,000			6,063			0,000		
Nr. 6	47,746			10,610			0,000		

60 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	10,610	13,328	4,801	23,873	32,322	15,927	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	0,000			23,579			0,000		
Nr. 3	21,221			109,640			0,000		
Nr. 4	28,294			0,000			0,000		
Nr. 5	19,843			23,579			0,000		
Nr. 6	0,000			13,263			0,000		

ANHANG

7.2.2 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen

vor Ischämie									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	26,526	24,204	7,728	0,000	5,053	5,053	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	11,789			0,000			0,000		
Nr. 3	17,684			0,000			0,000		
Nr. 4	35,368			0,000			0,000		
Nr. 5	53,855			0,000			0,000		
Nr. 6	0,000			30,315			0,000		

5 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	23,873	49,070	10,304	0,000	78,063	26,391	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	35,368			26,526			0,000		
Nr. 3	69,851			87,535			0,000		
Nr. 4	76,630			182,733			0,000		
Nr. 5	68,083			63,662			0,000		
Nr. 6	20,614			107,922			0,000		

10 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	47,746	56,494	12,247	0,000	56,750	22,023	0,000	4,175	2,648
Nr. 2	51,873			35,368			11,789		
Nr. 3	58,946			41,262			0,000		
Nr. 4	72,630			158,523			13,263		
Nr. 5	99,282			41,683			0,000		
Nr. 6	8,488			63,662			0,000		

30 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	46,989	49,647	10,604	0,000	63,157	22,369	0,000	11,621	7,391
Nr. 2	29,382			53,052			0,000		
Nr. 3	55,409			0,000			31,831		
Nr. 4	55,578			128,840			37,894		
Nr. 5	92,840			106,103			0,000		
Nr. 6	17,684			90,946			0,000		

60 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	32,841	63,517	14,228	0,000	57,741	20,615	0,000	6,029	4,392
Nr. 2	67,038			9,646			9,646		
Nr. 3	83,114			97,261			26,526		
Nr. 4	120,250			70,736			0,000		
Nr. 5	51,329			39,961			0,000		
Nr. 6	26,526			128,840			0,000		

ANHANG

90 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	31,831	55,309	12,084	0,000	60,337	21,396	0,000	11,838	6,858
Nr. 2	53,266			10,610			10,610		
Nr. 3	89,430			128,334			17,684		
Nr. 4	75,746			46,273			42,736		
Nr. 5	70,971			63,662			0,000		
Nr. 6	10,610			113,143			0,000		

7.2.3 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen, die mit GPVI-aCD133 vorinkubiert wurden

vor Ischämie

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	42,441	8,488	8,488	16,977	16,481	8,725	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	0,000			0,000			0,000		
Nr. 3	0,000			0,000			0,000		
Nr. 4	0,000			47,746			0,000		
Nr. 5	0,000			17,684			0,000		

5 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	17,684	32,753	10,656	226,943	130,089	31,218	0,000	4,244	4,244
Nr. 2	21,221			42,441			21,221		
Nr. 3	70,736			97,261			0,000		
Nr. 4	41,262			165,050			0,000		
Nr. 5	12,861			118,750			0,000		

10 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	115,366	89,944	12,736	296,416	137,572	50,582	0,000	10,711	7,519
Nr. 2	111,156			0,000			15,158		
Nr. 3	97,261			132,629			0,000		
Nr. 4	80,841			187,954			38,399		
Nr. 5	45,094			70,862			0,000		

30 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	75,788	44,675	8,863	263,742	138,909	33,036	0,000	7,074	4,875
Nr. 2	26,526			66,315			0,000		
Nr. 3	35,368			118,735			0,000		
Nr. 4	33,347			117,724			24,757		
Nr. 5	52,344			128,031			10,610		

ANHANG

60 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	76,925	66,176	12,045	198,944	169,132	34,111	42,441	25,276	8,215
Nr. 2	21,221			51,578			11,789		
Nr. 3	92,209			145,260			35,368		
Nr. 4	75,451			254,648			0,000		
Nr. 5	65,077			195,230			36,782		

90 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	83,064	78,102	11,327	160,368	131,162	34,359	20,614	8,544	3,963
Nr. 2	55,409			21,221			0,000		
Nr. 3	113,935			155,871			8,842		
Nr. 4	52,041			224,333			0,000		
Nr. 5	86,062			94,019			13,263		

7.2.4 Verwendung von humanen CD34+ Progenitorzellen, die mit GPVI-Fc und aCD133 vorinkubiert wurden

vor Ischämie

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	0,000	4,067	2,676	0,000	49,338	32,570	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	13,263			161,808			0,000		
Nr. 3	0,000			0,000			0,000		
Nr. 4	0,000			84,883			0,000		
Nr. 5	7,074			0,000			0,000		

5 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	52,715	28,959	8,591	139,197	38,273	25,942	0,000	0,000	0,000
Nr. 2	28,421			0,000			0,000		
Nr. 3	0,000			21,221			0,000		
Nr. 4	37,136			0,000			0,000		
Nr. 5	26,526			30,947			0,000		

10 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	73,565	31,336	11,576	97,817	59,411	12,620	26,273	5,255	5,255
Nr. 2	13,263			37,136			0,000		
Nr. 3	17,684			42,441			0,000		
Nr. 4	38,905			81,346			0,000		
Nr. 5	13,263			38,315			0,000		

ANHANG

30 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	51,738	37,126	14,035	120,453	76,212	15,779	26,273	8,650	5,497
Nr. 2	34,761			36,884			0,000		
Nr. 3	81,447			64,470			16,977		
Nr. 4	0,000			53,995			0,000		
Nr. 5	17,684			105,261			0,000		

60 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	59,014	23,853	10,414	91,754	95,655	9,197	24,252	4,850	4,850
Nr. 2	10,610			80,462			0,000		
Nr. 3	34,484			96,377			0,000		
Nr. 4	0,000			79,577			0,000		
Nr. 5	15,158			130,103			0,000		

90 Min. nach Reperfusion

Tier	Trans. Adh. CD34+			Rollende CD34+			Adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	82,356	27,578	14,588	64,672	85,624	21,600	25,768	5,154	5,154
Nr. 2	0,000			23,873			0,000		
Nr. 3	9,431			104,756			0,000		
Nr. 4	15,158			80,714			0,000		
Nr. 5	30,947			154,102			0,000		

7.3 Daten des Darmmodells - Venolen

7.3.1 Verwendung von humanen Endothelzellen (hEC)

vor Ischämie

Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	116,655	100,164	23,848	126,558	159,887	40,001	0,000	3,200	3,200
Nr. 2	204,123			308,306			19,200		
Nr. 3	53,115			37,199			0,000		
Nr. 4	108,343			222,227			0,000		
Nr. 5	45,683			85,472			0,000		
Nr. 6	73,067			179,559			0,000		

ANHANG

5 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	96,318	77,080	4,594	182,498	183,931	10,401	30,534	30,650	6,035
Nr. 2	84,722			222,013			46,782		
Nr. 3	67,814			153,691			26,709		
Nr. 4	74,272			199,533			46,273		
Nr. 5	68,871			158,910			7,074		
Nr. 6	70,483			186,944			26,526		

10 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	94,962	74,678	11,350	207,786	197,911	11,664	37,667	30,965	6,482
Nr. 2	122,019			238,732			31,831		
Nr. 3	62,731			169,951			30,342		
Nr. 4	55,092			220,368			26,526		
Nr. 5	52,508			173,026			5,305		
Nr. 6	60,753			177,599			54,121		

30 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	65,947	71,419	6,995	192,568	188,406	11,837	30,549	35,507	4,895
Nr. 2	66,749			190,343			21,864		
Nr. 3	79,687			162,828			36,568		
Nr. 4	45,192			157,190			41,262		
Nr. 5	73,957			188,565			27,178		
Nr. 6	96,982			238,942			55,620		

60 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. hEC			rollende hEC			adh. hEC		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	65,020	74,739	12,344	158,619	193,690	12,253	36,440	48,229	6,662
Nr. 2	132,532			248,546			73,845		
Nr. 3	49,845			182,591			41,722		
Nr. 4	78,353			188,809			61,123		
Nr. 5	52,835			199,222			30,267		
Nr. 6	69,851			184,354			45,978		

7.3.2 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen

vor Ischämie

Tier	trans. adh. CD34 ⁺			rollende CD34 ⁺			adh. CD34 ⁺		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	36,172	51,154	8,812	120,744	139,945	23,792	4,823	0,804	0,804
Nr. 2	31,740			175,206			0,000		
Nr. 3	57,009			107,956			0,000		
Nr. 4	40,673			102,567			0,000		
Nr. 5	50,385			90,678			0,000		
Nr. 6	90,946			242,522			0,000		

ANHANG

5 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	60,177	73,580	9,943	139,139	165,913	19,103	35,692	33,013	6,726
Nr. 2	75,167			150,130			56,293		
Nr. 3	33,865			92,234			33,865		
Nr. 4	81,598			207,828			43,452		
Nr. 5	85,454			207,205			12,861		
Nr. 6	105,219			198,944			15,915		

10 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	44,631	71,167	12,908	125,808	154,483	17,965	23,579	28,836	3,162
Nr. 2	42,063			116,725			23,184		
Nr. 3	41,262			108,068			33,403		
Nr. 4	93,842			193,344			23,343		
Nr. 5	108,192			214,198			42,477		
Nr. 6	97,009			168,755			27,031		

30 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	54,234	58,899	7,629	171,716	149,016	8,231	39,004	26,445	3,867
Nr. 2	53,405			147,307			34,130		
Nr. 3	69,817			138,371			26,067		
Nr. 4	26,251			119,150			26,251		
Nr. 5	75,311			171,398			12,243		
Nr. 6	74,376			146,152			20,978		

60 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	43,957	72,071	8,167	181,891	168,226	12,576	28,799	40,146	6,478
Nr. 2	64,570			166,247			42,895		
Nr. 3	64,841			132,629			53,052		
Nr. 4	104,335			219,280			62,778		
Nr. 5	78,925			167,138			33,032		
Nr. 6	75,801			142,171			20,319		

90 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	45,069	71,159	9,837	118,204	151,381	14,999	25,793	36,941	6,005
Nr. 2	53,845			151,277			23,635		
Nr. 3	50,104			97,261			47,157		
Nr. 4	84,756			174,565			61,388		
Nr. 5	97,198			191,253			35,452		
Nr. 6	95,979			175,724			28,218		

ANHANG

7.3.3 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen, die mit GPVI-aCD133 vorinkubiert wurden

vor Ischämie									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	128,031	109,876	14,945	256,770	230,141	23,658	0,000	4,598	4,598
Nr. 2	119,745			300,626			22,989		
Nr. 3	70,104			168,628			0,000		
Nr. 4	150,313			235,785			0,000		
Nr. 5	81,185			188,896			0,000		

5 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	167,317	152,538	5,807	259,817	267,010	9,065	84,339	54,556	8,128
Nr. 2	160,334			297,089			51,873		
Nr. 3	132,856			263,445			55,319		
Nr. 4	152,460			272,963			36,252		
Nr. 5	149,724			241,736			44,996		

10 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	76,041	128,420	17,298	171,534	252,160	25,271	31,831	70,259	14,076
Nr. 2	102,374			247,189			63,662		
Nr. 3	151,576			323,362			116,208		
Nr. 4	171,846			282,526			56,935		
Nr. 5	140,265			236,187			82,659		

30 Min. nach Reperfusion									
Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	80,167	134,751	17,171	155,618	221,743	20,834	51,873	60,787	7,751
Nr. 2	158,230			261,830			83,939		
Nr. 3	113,833			198,129			37,484		
Nr. 4	143,803			225,227			64,323		
Nr. 5	177,723			267,911			66,315		

ANHANG

60 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	100,174	118,262	13,181	181,624	238,646	25,781	35,576	67,691	10,102
Nr. 2	107,144			250,695			90,292		
Nr. 3	114,945			240,501			69,851		
Nr. 4	169,765			327,152			86,651		
Nr. 5	99,282			193,260			56,083		

90 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	78,548	144,606	24,513	168,884	228,766	19,335	50,344	66,622	10,179
Nr. 2	221,710			283,062			83,319		
Nr. 3	116,208			206,522			64,672		
Nr. 4	133,892			237,153			39,789		
Nr. 5	172,670			248,206			94,988		

7.3.4 Verwendung von humanen CD34⁺ Progenitorzellen, die mit GPVI-Fc und aCD133 vorinkubiert wurden

vor Ischämie

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	30,505	63,196	14,600	164,460	146,339	6,805	0,000	4,093	4,093
Nr. 2	97,422			158,190			0,000		
Nr. 3	81,438			132,767			20,463		
Nr. 4	25,969			146,467			0,000		
Nr. 5	80,646			129,811			0,000		

5 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	89,721	111,464	18,313	192,303	209,529	14,742	43,789	31,709	11,096
Nr. 2	67,199			187,449			0,000		
Nr. 3	176,343			266,958			54,604		
Nr. 4	117,733			193,393			10,307		
Nr. 5	106,322			207,543			49,845		

10 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	99,244	92,219	13,895	187,342	180,251	18,419	51,444	36,654	8,396
Nr. 2	57,026			136,200			9,549		
Nr. 3	134,093			245,278			54,343		
Nr. 4	104,419			175,491			25,936		
Nr. 5	66,315			156,944			41,999		

ANHANG

30 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	93,549	114,448	20,189	177,727	223,943	23,445	47,126	31,118	9,487
Nr. 2	53,141			196,934			0,000		
Nr. 3	148,545			302,748			38,905		
Nr. 4	109,893			190,312			19,158		
Nr. 5	167,113			251,995			50,399		

60 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	93,881	92,487	6,501	170,759	185,621	7,081	50,228	26,734	5,891
Nr. 2	75,687			191,340			20,867		
Nr. 3	86,932			177,844			22,065		
Nr. 4	90,505			177,564			21,221		
Nr. 5	115,428			210,599			19,292		

90 Min. nach Reperfusion

Tier	trans. adh. CD34+			rollende CD34+			adh. CD34+		
	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM	1/mm ²	mean	SEM
Nr. 1	66,663	81,316	12,705	177,911	179,413	12,489	33,439	27,647	7,230
Nr. 2	41,620			131,492			27,473		
Nr. 3	114,073			196,268			40,214		
Nr. 4	100,227			193,924			37,109		
Nr. 5	83,998			197,470			0,000		

8 LITERATURVERZEICHNIS

ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MAGNER M, ISNER JM (1999).

Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularisation.

Circ. Res. 85, 221-228.

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM (1997).

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.

Science 275, 964-967.

AXEL DI, BREHM BR, WOLBURG-BUCHHOLZ K, BETZ EL, KÖVEKER G, KARSCH KR (1996).

Induction of cell-rich and lipid-rich plaques in a transfilter coculture system with human vascular cells.

J Vasc Res 33, 327-339.

BAUMGARTNER HR (1977).

Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with α chymotrypsin-digested subendothelium.

Thromb Haemost 37, 1-16.

BECKER BF, HEINDL B, KUPATT C, ZAHLER S (2000).

Endothelial function and hemostasis.

Z Kardiol 89, 160-167.

BECKER MD, CRESPO S, MARTIN TM, PLANCK SR, NARAMURA M, ROSENBAUM JT (2001).

Intraocular in vivo imaging of activated T-lymphocytes expressing green-fluorescent protein after stimulation with endotoxin.

Graefè's Arch Clin Exp Ophthalmol 239, 609-612.

BORN GV, CROSS MJ (1963).

The aggregation of blood platelets.

J Physiol 168, 178-195.

BÜHRING H, MARXER A, LAMMERS R, WISSINGER B (2002).

CD133 cluster report.

In: Mason D (editor). Leucocyte Typing VII. White cell differentiation antigens. Oxford University Press, Oxford, 622-623.

BÜLTMANN A, LI Z, WAGNER S, PELUSO M, BAUMGARTNER C, SCHÖNBERGER T, WEIS C, KONRAD I, STELLOS K, MASSBERG S, GAWAZ M, UNGERER M, MÜNCH G.

LITERATURVERZEICHNIS

Inhibition of glycoprotein VI attenuates atherosclerosis and endothelial dysfunction by inhibiting platelet interaction with the endothelium.
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (submitted).

CARMELIET P (2003).
Angiogenesis in health and disease.
Nat Med 9, 653-660.

CELERMAJER DS (1997).
Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?
J Am Coll Cardiol 30, 325-333.

CHAN JY, WATT SM (2001).
Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells.
Br J of Haematol 112, 541-557.

CHAVAKIS E, AICHER A, HEESCHEN C, SASAKI K, KAISER R, MAKHFI NE, URBICH C, PETERS T, SCHARFFETTER-KOCHANNEK K, ZEIHNER AM, CHAVAKIS T, DIMMELER S. (2005).
Role of β 2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells.
J Exp Med 201, 63-72.

CHEN Y, LUI VC, ROOIJEN NV, TAM PK (2004).
Depletion of intestinal resident macrophages prevents ischaemia reperfusion injury in gut.
Gut 53, 1772-1780.

CHOI ET, KHAN MF, LEIDENFROST JE, COLLINS ET, BOC KP, VILLA BR, NOVACK DV, PARKS WC, ABENDSCHEIN DR (2004).
 β ₃-Integrin mediates smooth muscle cell accumulation in neointima after carotid ligation in mice.
Circulation 109, 1564-1569.

CLEMETSON JM, POLGAR J, MAGNENAT E, WELLS TNC, CLEMETSON KJ (1999).
The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer cells.
Biol Chem 274, 29019-29024.

CLEMETSON KJ, CLEMETSON JM (2001).
Platelet collagen receptors.
Thromb Haemost 86, 189-197.

CLEMETSON KJ, MCGREGOR JL, JAMES E DECHAVANNE M, LÜSCHER EF (1982).
Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier-Syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis.
J Clin Invest 70, 304-311.

DAR A, KOLLET O, LAPIDOT T (2006).

LITERATURVERZEICHNIS

Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice.

Exp Hematol 34, 967-975.

DAUB K, LANGER H, SEIZER P, STELLOS K, MAY AE, GOYAL P, BIGALKE B, SCHÖNBERGER T, GEISLER T, SIEGEL-AXEL D, OOSTENDORP RA, LINDEMANN S, GAWAZ M (2006).

Platelets induce differentiation of human CD34⁺ progenitor cells into foam cells and endothelial cells.

FASEB J 20, E1935-E1944.

DZAU VJ, GIBBONS GH, COOKE JP, OMOIGUI N (1993).

Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives.

Circulation 87, 705-719.

EICHHORN ME, NEY L, MASSBERG S, GOETZ AE (2002).

Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy.

J Vasc Res 39, 330-339.

ERIKSSON EE, WERR J, GUO Y, THOREN P, LINDBOM L (2000).

Direct observations in vivo on the role of endothelial selectins and α_4 integrin in cytokine-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse aorta.

Circ Res 86, 526-533.

FALK E (1991).

Coronary thrombosis: Pathogenesis and clinical manifestations.

Am J Cardiol 68, 28B-38B.

FERRARI R, CECONI C, CURELLO S, GUARNIERI C, CALDARERA CM, ALBERTINI A, VISIOLI O (1985).

Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity.

J Mol Cell Cardiol 17, 937-945.

FORMAN MB, VIRMANI R, PUETT DW (1990).

Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury.

Circulation 81 (3 Suppl), IV 69-78.

FRENETTE PS, JOHNSON RC, HYNES RO, WAGNER DD (1995).

Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin.

Proc Natl Acad Sci USA 92, 7450-7454.

FRENETTE PS, MOYNA C, HARTWELL DW, LOWE JB, HYNES RO, WAGNER DD (1998).

Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules.

Blood 91, 1318-1324.

FUSTER V, BADIMON JJ, CHESEBRO JH (1998).

LITERATURVERZEICHNIS

Atherothrombosis: mechanisms and clinical therapeutic approaches.
Vascular Medicine 3, 231-239.

GAWAZ M (1999).
Das Blutplättchen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1-41.

GAWAZ M (2004).
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium.
Cardiovasc Res 61, 498-511.

GAWAZ M, KONRAD I, HAUSER AI, SAUER S, LI Z, WESTER HJ, BENDEL FM, SCHWAIGER M, SCHOMIG A, MASSBERG S, HAUBNER R (2005).
Non-invasive imaging of glycoprotein VI binding to injured arterial lesions.
Thromb Haemost 93, 910-913.

GAWAZ M, LANGER H, MAY AE (2005).
Platelets in inflammation and atherogenesis.
J Clin Invest 115, 3378-3384.

GAWAZ M, NEUMANN FJ, DICKFELD T, REININGER A, ADELSBERGER H, GEBHARDT A, SCHÖMIG A (1997).
Vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction.
Circulation 96, 1809-1818.

GAWAZ MP, LOFTUS JC, BAJT ML, FROJMOVIC MM, PLOW EF, GINSBERG MH (1991).
Ligand bridging mediates integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions.
J Clin Invest 88, 1128-1134.

GEORGE JN (2000).
Platelets.
Lancet 355, 1531-1539.

GIBBINS J, ASSELIN J, FARNDAL R, BARNES M, LAW C-L, WATSON SP (1996).
Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain in collagen-stimulated platelets.
J Biol Chem 271, 18095-18099.

GIBBINS JM, OKUMA M, FARNDAL R, BARNES M, WATSON SP (1997).
Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain.
FEBS Lett 413, 255-259.

GIBBONS GH, DZAU VJ (1994).
The emerging concept of vascular remodeling.
N Engl J Med 330, 1431-1438.

GILL M, DIAS S, HATTORI K, RIVERA ML, HICKLIN D, WITTE L, GIRARDI L, YURT R, HIMEL H, RAFII S (2001).

LITERATURVERZEICHNIS

Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursor cells.

Circ Res 88, 167-174.

GIMBRONE MA, JR. (1999).

Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.

Am J Pathol 155, 1-5.

GONZALEZ AP, SEPULVEDA S, MASSBERG S, BAUMEISTER R, MENGER MD (1994).

In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats.

Transplantation 58, 403-408.

GONZÁLEZ-AMARO R, SÁNCHEZ-MADRID F (1999)

Cell adhesion molecules: selectins and integrins.

Crit Rev Immunol 19, 389-429.

GOTO S, TAMURA N, HANDA S, ARAI M, KODAMA K, TAKAYAMA H (2002).

Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions.

Circulation 106, 266-272.

GRAYSON MH, CHAPLIN DD, KARL IE, HOTCHKISS RS (2001).

Confocal fluorescent intravital microscopy of the murine spleen.

J Immunol Methods 256, S. 55-63.

HEARSE DJ, MAXWELL L, SALDANHA C, GAVIN JB (1993).

The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection.

J Mol Cell Cardiol 25, 759-800.

HENKE J, ERHARDT W (2004).

Speziesspezifische Anästhesie-Nager.

In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J (Hrsg.): Anästhesie & Analgesie beim Klein- und Heimtier. Schattauer Verlag, Stuttgart, 642-663.

HICKS C, WONG R, MANOHARAN A, KWAN YL (2007).

Viable CD34⁺/CD133⁺ blood progenitor cell dose as a predictor of haematopoietic engraftment in multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation.

Ann Hematol 86, 591-598.

HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIWI MA, QUYYUMI AA, FINKEL T (2003).

Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.

N Engl J Med 348, 593-600.

HRISTOV M, ERL W, WEBER PC (2003).

Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 23, 1185-1189.

HRISTOV M, WEBER C (2004).

Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance.

J Cell Mol Med 8, 498-508.

HRISTOV M, ZERNECKE A, LIEHN EA, WEBER C (2007).

Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury.

Thromb Haemost 98, 274-277.

JACKSON SP, MISTRY N, YUAN Y (2001)

Platelets and the injured vessel wall-“rolling into action”.

Trends Cardiovasc Med 10, 192-197.

JANDROT-PERRUS M, BUSFIELD S, LAGRUE A-H, XIONG X, DEBILI N, CHICKERING T, LECOUEDIC J-P, GOODEARL A, DUSSAULT B, FRASER C, VAINCHENKER W, VILLEVAL J-L (2000).

Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily.

Blood 96, 1798-1807.

JANDROT-PERRUS M, LAGRUE A-H, OKUMA M, BON C (1997).

Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin $\alpha_2\beta_1$.

J Biol Chem 272, 27035-27041.

JENNINGS RB, REIMER KA, HILL ML, MAYER SE (1981).

Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo.

Circ Res 49, 892-900.

JENNINGS RB, SCHAPER J, HILL ML, STEENBERGER C JR, REIMER KA (1985).

Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in the cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure.

Circ Res 56, 262-278.

JUNG G, HONSIK CJ, REISFELD RA, MÜLLER-EBERHARD HJ (1986).

Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates.

Proc Natl Acad Sci USA 83, 4479-4483.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J (1996).

Histologie.

Aufl. 4, Springer Verlag, Berlin, 285-304.

KAMIHATA H, MATSUBARA H, NISHIUE T, FUJIYAMA S, TSUTSUMI Y, OZONO R, MASAKI H, MORI Y, IBA O, TATEISHI E, KOSAKI A, SHINTANI S, MUROHARA T, IMAIZUMI T, IWASAKA T (2001).

LITERATURVERZEICHNIS

Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines.

Circulation 104, 1046-1052.

KAWAMOTO A, TKEBUCHAVA T, YAMAGUCHI J, NISHIMURA H, YOON Y, MILLIKEN C, UCHIDA S, MASUO O, IWAGURO H, MA H, HANLEY A, SILVER M, KEARNEY M, LOSORDO DW, ISNER JM, ASAHARA T (2003).

Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia.

Circulation 107, 461-468.

KLONER RA, GANOTE CE, JENNINGS RB (1974).

The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog.

J Clin Invest 54, 1496-1508.

KOGAKI S, SAWA Y, SANO T, MATSUSHITA T, OHATA T, KUROTOBI S, TOJO SJ, MATSUDA H, OKADA S (1999).

Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury.

Cardiovasc Res 43, 968-973.

KOSEKI S, MIURA S, FUJIMORI H, HOKARI R, KOMOTO S, HARA Y, OGINO T, NAGATA H, GOTO M, HACHIMURA S, KAMINOGAWA S, ISHII H (2001).

In situ demonstration of intraepithelial lymphocyte adhesion to villus microvessels of the small intestine.

Int Immunol 13, 1165-1174.

KUSCHINSKY W (1999).

Herz-Kreislauf-Funktion.

In: Deetjen P, Speckmann EJ (Hrsg.): Physiologie. Aufl. 3, Urban & Fischer Verlag, München, 297-348.

LANG P, BADER P, SCHUMM M, FEUCHTINGER T, EINSELE H, FÜHRER M, WEINSTOCK C, HANDGRETINGER R, KUCI S, MARTIN D, NIETHAMMER D, GREIL J (2004).

Transplantation of a combination of CD133⁺ and CD34⁺ selected progenitor cells from alternative donors.

Br J Haematol 124, 72-79.

LANGER H, GAWAZ M (2006).

The role of platelets for the pathophysiology of acute coronary syndromes.

Hamostaseologie 26, 114-118.

LANGER H, MAY AE, DAUB K, HEINZMANN U, LANG P, SCHUMM M, VESTWEBER D, MASSBERG S, SCHÖNBERGER T, PFISTERER I, HATZOPOULOS AK GAWAZ M (2006).

Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro.

Circ Res 98, 2-10.

LITERATURVERZEICHNIS

LAPIDOT T, PETIT I (2002).

Current understanding of stem cell mobilization: the role of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.

Exp Hematol 30, 973-981.

LEE RJ, FANG Q, DAVOL PA, GU Y, SIEVERS RE, GRABERT RC, GALL JM, TSANG E, YEE MS, FOK H, HUANG NF, PADBURY JF, LARRICK JW, LUM LG (2007).

Antibody targeting of stem cells to infarcted myocardium.

Stem Cells 25, 712-717.

LEFER AM, CAMPBELL B, SCALIA R, LEFER DJ (1998).

Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins.

Circulation 98, 1322-1328.

LÉVESQUE JP, LEAVESLEY DI, NIUTTA S, VADAS M, SIMMONS PJ (1995).

Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins.

J Exp Med 181, 1805-1815.

LEVESQUE J-P, SIMMONS PJ (1999).

Cytoskeleton and integrin-mediated adhesion signaling in human CD34⁺ hemopoietic progenitor cells.

Exp Hematol 27, 579-586.

LIAO JK (1998).

Endothelium and acute coronary syndromes.

Clin Chem 44, 1799-1808.

LIBBY P (1998).

The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms.

Vascular Medicine 3, 225-229.

LIBBY P (2002).

Inflammation in atherosclerosis.

Nature 420, 868-874.

LIEBICH HG (1999).

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere.

Aufl. 3, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 118-131.

LINDNER V, FINGERLE J, REIDY MA (1993).

Mouse model of arterial injury.

Circ Res 73, 792-796.

LUM LG, FOK H, SIEVERS R, ABEDI M, QUESENBERY PJ, LEE RJ (2004).

Targeting of Lin-Sca⁺ hematopoietic stem cells with bispecific antibodies to injured myocardium.

Blood Cells, Molecules, and Diseases 32, 82-87.

LITERATURVERZEICHNIS

LUSIS AJ (2000).

Atherosclerosis.

Nature 407, 233-241.

MAJESKY MW (2002).

Mouse model for atherosclerotic plaque rupture.

Circ 105, 2010-2011.

MASSBERG S, BRAND K, GRÜNER S, PAGE S, MÜLLER E, MULLER I, BERGMEIER W, RICHTER T, LORENZ M, KONRAD I, NIESWANDT B, GAWAZ M (2002).

A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation.

J Exp Med 196, 887-896.

MASSBERG S, EISENMENGER S, ENDERS G, KROMBACH F, MESSMER K (1998a).

Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse.

Res Exp Med 198, 23-35.

MASSBERG S, ENDERS G, LEIDERER R, EISENMENGER S, VESTWEBER D, KROMBACH F, MESSMER K (1998b).

Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin.

Blood 92, 507-515.

MASSBERG S, ENDERS G, MATOS FC, TOMIC LI, LEIDERER R, EISENMENGER S, MESSMER K, KROMBACH F (1999).

Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo.

Blood 94, 3829-3838.

MASSBERG S, GAWAZ M, GRÜNER S, SCHULTE V, KONRAD I, ZOHLNHÖFER D, HEINZMANN U, NIESWANDT B (2003a).

A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.

J Exp Med 197, 41-49.

MASSBERG S, KONRAD I, BÜLTMANN A, SCHULZ C, MÜNCH G, PELUSO M, LORENZ M, SCHNEIDER S, BESTA F, MÜLLER I, HU B, LANGER H, KREMMER E, RUDELIUS M, HEINZMANN U, UNGERER M, GAWAZ M (2003b).

Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo.

Faseb J 18, 397-399.

MASSBERG S, KONRAD I, SCHÜRZINGER K, LORENZ M, SCHNEIDER S, ZOHLNHOFER D, HOPPE K, SCHIEMANN M, KENNERKNECHT E, SAUER S, SCHULZ C, KERSTAN S, RUDELIUS M, SEIDL S, SORGE F, LANGER H, PELUSO M, GOYAL P, VESTWEBER D, EMAMBOKUS NR, BUSCH DH, FRAMPTON J, GAWAZ M (2006).

Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 α and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo.

J Exp Med 203, 1221-1233.

LITERATURVERZEICHNIS

- MASSBERG S, VOGT F, DICKFELD T, BRAND K, PAGE S, GAWAZ M (2003).
Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells.
Thromb Res 110, 187-194.
- MAXWELL SR, LIP GY (1997).
Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options.
Int J Cardiol 58, 95-117.
- MENGER MD, LEHR HA (1993).
Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo.
Immunology Today 14, 519-522.
- MILLER-KASPRZAK E, JAGODZINSKI PP (2007).
Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair.
Arch Immunol Ther Exp 55, 247-259.
- MIURA Y, OHNUMA M, JUNG SM, MOROI M (2000).
Cloning and expression of the platelet-specific collagen receptor glycoprotein VI.
Thrombosis Research 98, 301-309.
- MIURA Y, TAKAHASHI T, JUNG SM, MOROI M (2002).
Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen.
Biol Chem 277, 46197-46204.
- MOROI M, JUNG SM (1997).
Platelet receptors for collagen.
Thromb Haemost 78, 439-444.
- MOROI M, JUNG SM (2004).
Platelet glycoprotein VI: its structure and function.
Thromb Res 114, 221-233.
- MOROI M, JUNG SM, OKUMA M, SHINMYOZU K (1989).
A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion.
J Clin Invest 84, 1440-1445.
- MURRAY CJL, LOPEZ AD (1997a).
Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study.
Lancet 349, 1498-1504.
- MURRAY CJL, LOPEZ AD (1997b).
Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study.
Lancet 349, 1436-1442.
- NAYLER WG, ELZ JS (1986).

LITERATURVERZEICHNIS

Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma?
Circulation 74, 215-221.

NEWMAN PJ (2006).
New role for the GPVI/FcR γ chain complex.
Blood 107, 1248-1249.

NIESWANDT B, BERGMEIER W, SCHULTE V, RACKEBRANDT K, GESSNER JE, ZIRNGIBL H (2000).
Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR γ chain.
J Biol Chem 275, 23998-24002.

NIESWANDT B, BRAKEBUSCH C, BERGMEIER W, SCHULTE V, BOUVARD D, MOKHTARI-NEJAD R, LINDHOUT T, HEEMSKERK JWM, ZIRNGIBL H, FÄSSLER R (2001a).
Glycoprotein VI but not α 2 β 1 integrin is essential for platelet interaction with collagen.
EMBO J 20, 2120-2130.

NIESWANDT B, SCHULTE V, BERGMEIER W, MOKHTARI-NEJAD R, RACKEBRANDT K, CAZENAVE J-P, OHLMANN P, GACHET C, ZIRNGIBL H (2001b).
Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice.
J Exp Med 193, 459-469.

NIESWANDT B, WATSON SP (2003).
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?
Blood 102, 449-461.

PAIGEN B, PLUMP AS, RUBIN EM (1994).
The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia.
Curr Opin Lipidol 5, 258-264.

PASQUET J-M, 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 (1999).
LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase $\text{c}\gamma$ 2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI.
Mol Cell Biol 19, 8326-8334.

PASSEGUÉ E, JAMIESON CH, AILLES LE, WEISSMAN IL (2003).
Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?
Proc Natl Acad Sci 100, 11842-11849.

PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MA, RAFII S (2000).
Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors.

LITERATURVERZEICHNIS

Blood 95, 952-958.

PHILLIPS DR, CHARO IF, PARISE LV, FITZGERALD LA (1988).
The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex.
Blood 71, 831-843.

POLGÁR J, CLEMETSON JM, KEHREL BE, WIEDEMANN M, MAGNENAT EM, WELLS TN, CLEMETSON KJ (1997).
Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor.
J Biol Chem 272, 13576-13583.

RAFII S, LYDEN D (2003).
Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration.
Nat Med 9, 702-712.

RAUSCHER FM, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, DAVIS BH, WANG T, GREGG D, RAMASWAMI P, PIPPEN AM, ANNEX BH, DONG C, TAYLOR DA (2003).
Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis.
Circulation 108, 457-463.

READ TA, FARHADI M, BJERKVIG R, OLSEN BR, ROKSTAD AM, HUSZTHY PC, VAJKOCZY (2001).
Intravital microscopy reveals novel antivasular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells.
Cancer Res 61, 6830-6837.

REIMER KA, JENNINGS RB (1992).
Myocardial ischemia, hypoxia and infarction.
In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE (editors). The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press 1992, 1875-1973.

ROESSNER A (2004).
Grundlagen zur Pathologie des Kreislaufs.
In: Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK Hrsg.): Allgemeine Pathologie. Aufl. 10, Urban & Fischer Verlag, München, 249-280.

ROESSNER A, KIRKPATRICK CJ, SCHMID KW (2001a).
Allgemeine Kreislaufpathologie.
In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.): Pathologie. Aufl. 2, Urban & Fischer Verlag, München, 213-240.

ROESSNER A, KIRKPATRICK CJ, SCHNEIDER J (2001b).
Gefäße.
In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.): Pathologie. Aufl. 2, Urban & Fischer Verlag, München, 465-479.

ROSS R (1999).
Atherosclerosis is an inflammatory disease.
Am Heart J 138, 419- 420.

RUGGERI ZM (2002)

Platelets in atherothrombosis.

Nat Med 8, 1227-1234.

RUGGERI ZM (2003).

Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions.

J Thromb Haemost 1, 1335-1342.

SÁNCHEZ-MADRID F, DEL POZO MA (1999).

Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions.

EMBO J 18, 501-511.

SAVAGE B, SALDIVAR E, RUGGERI ZM (1996).

Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor.

Cell 84, 289-297.

SCHULTE V, REUSCH HP, POZGAJOVÁ M, VARGA-SZABÓ D, GACHET C, NIESWANDT B (2006).

Two-phase antithrombotic protection after anti-glycoprotein VI treatment in mice.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 1640-1647.

SIEGEL-AXEL D, LANGER H, LINDEMANN S, GAWAZ M (2006).

Role of platelets in atherosclerosis and inflammation.

Med Klin (Munich) 101, 467-475.

SIMMONS PJ, LEVESQUE J-P, ZANNETTINO AC (1997).

Adhesion molecules in haemopoiesis.

Baillière`s Clin Haematol 10, 485-505.

SIXMA JJ, VAN ZANTEN GH, HUIZINGA EG, VAN DER PLAS RM, VERKLEY M, WU Y-P, GROS P, DE GROOT PG (1997).

Platelet adhesion to collagen: an update.

Thromb Haemost 78, 434-438.

STEINHUBL SR, MOLITERNO DJ (2005).

The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis.

Am J Cardiovasc Drugs 5 (6), 399-408.

STELLOS K, LANGER H, DAUB K, SCHOENBERGER T, GAUSS A, GEISLER T, BIGALKE B, MUELLER I, SCHUMM M, SCHAEFER I, SEIZER P, KRAEMER BF, SIEGEL-AXEL D, MAY AE, LINDEMANN S, GAWAZ M (2008).

Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34⁺ cells to endothelial progenitor cells.

Circulation 117, 000-000.

STRAUER BE (2001).

Akuter Myokardinfarkt.

Internist 42, 629-630.

LITERATURVERZEICHNIS

SUGIYAMA T, OKUMA M, USHIKUBI F, SENSAKI S, KANAJI K, UCHINO H (1987).

A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia.

Blood 69, 1712-1720.

TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T (1999).

Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.

Nat Med 5, 434-438.

TEDDER TF, STEEBER DA, CHEN A, ENGEL P (1995).

The selectins: vascular adhesion molecules.

FASEB 9, 866-873.

TEMPLIN C, KOTLARZ D, MARQUART F, FAULHABER J, BRENDECKE V, SCHAEFER A, TSIKAS D, BONDA T, HILFIKER-KLEINER D, OHL L, NAIM HY, FOERSTER R, DREXLER H, LIMBOURG FP (2006).

Transcoronary delivery of bone marrow cells to the infarcted murine myocardium.

Basic Res Cardiol 101, 301-310.

TO LB, HAYLOCK DN, SIMMONS PJ, JUTTNER CA (1997).

The biology and clinical uses of blood stem cells.

Blood 89, 2233-2258.

TOPPER JN, GIMBRONE MA, JR. (1999).

Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype.

Mol Med Today 5, 40-46.

URBICH C, AICHER A, HEESCHEN C, DERNBACH E, HOFMANN WK, ZEIHNER AM, DIMMELER S (2005a).

Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells.

J Mol Cell Cardiol 39, 733-742.

URBICH C, DIMMELER S (2005b).

Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors.

Kidney International 67, 1672-1676.

VAJKOCZY P, ULLRICH A, MENGER MD (2000).

Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation.

Neoplasia 2, 53-61.

VANE JR, ÄNGGÅRD EE, BOTTING RM (1990).

Regulatory functions of the vascular endothelium.

N Engl J Med 323, 27-36.

LITERATURVERZEICHNIS

VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, ADLER K, URBICH C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S (2001).

Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.

Circ Res 89, e1-e7.

VERMEULEN M, LE PESTEUR F, GAGNERAULT M-C, MARY J-Y, SAINTENY F, LEPAULT F (1998).

Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells.

Blood 92, 894-900.

VOLLMAR B, LASCHKE MW, ROHAN R, KOENIG J, MENGER MD (2001).

In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles.

Am J Pathol 159, 1661-1670.

VOLLMAR B, MORGENTHALER M, AMON M, MENGER MD (2000).

Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 279, H1591-H1599.

WATSON S, BERLANGA O, BEST D, FRAMPTON J (2000).

Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid?

Platelets 11, 252-258.

WATSON SP, GIBBINS J (1998).

Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM.

View Immunol Today 19, 260-264.

WEISSMAN IL (2000).

Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.

Cell 100, 157-168.

WERNER N, JUNK S, LAUFS U, LINK A, WALENTA K, BÖHM M, NICKENIG G (2003).

Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury.

Circ Res 93, 17-24.

WEYRAUCH KD, SMOLLICH A, SCHNORR B (1998).

Histologie-Kurs für Veterinärmediziner.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 150-154.

WU X, LENSCH MW, WYLIE-SEARS J, DALEY GQ, BISCHOFF J (2007).

Hemogenic endothelial progenitor cells isolated from human umbilical cord blood.

Stem Cells 25, 2770-2776.

XU Q (2006).

The impact of progenitor cells in atherosclerosis.

Nature Clinical Practice 3, 94-101.

LITERATURVERZEICHNIS

- YEH ET, ZHANG S, WU HD, KÖRBLING M, WILLERSON JT, ESTROV Z (2003).
Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo.
Circulation 108, 2070-2073.
- YIN AH, MIRAGLIA S, ZANJANI ED, ALMEIDA-PORADA G, OGAWA M, LEARY AG, OLWEUS J, KEARNEY J, BUCK DW (1997).
AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.
Blood 90, 5002-5012.
- ZANNETTINO AC, BERNDT MC, BUTCHER C, BUTCHER EC, VADAS MA, SIMMONS PJ (1995).
Primitive human hematopoietic progenitors adhere to P-Selectin (CD62P).
Blood 85, 3466-3477.
- ZERNECKE A, WEBER C (2005).
Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease.
Basic Res Cardiol 100, 93-101.
- ZHENG Y-M, LIU C, CHEN H, LOCKE D, RYAN JC, KAHN ML (2001).
Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor γ -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen.
J Biol Chem 276, 12999-13006.
- ZOLOTAREVA AG, KOGAN ME (1978).
Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice.
Cor Vasa 20, 308-314.

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Ausgewählte Membranglykoproteine auf der Thrombozytenmembran 14

Tab. 2: Überblick über charakteristische Merkmale von EPCs, CEPs, HSCs und
HPC.....23

Tab. 3: Übersicht über den Versuchsaufbau 46

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Aufbau einer Arterie, einer Vene und einer Kapillare.....	4
Abb. 2:	Einfluss der Thrombozyten auf die Ischämie	8
Abb. 3:	Ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten	9
Abb. 4:	Überblick über die Stadien der Hämostase	11
Abb. 5:	Aufbau des Glykoprotein VI-FcR γ -chain-Komplexes	18
Abb. 6:	Hämatopoetische Stammzellen und Progenitorzelllinien	21
Abb. 7:	Modell der Atherogenese	25
Abb. 8:	Die Atherogenese im zeitlichen Verlauf.....	27
Abb. 9:	Bispezifisches Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133	31
Abb. 10:	Lage des Venenkatheters	34
Abb. 11:	Freipräparierte Carotiden einer Maus	35
Abb. 12:	Ausgelagertes Darmsegment einer Maus.....	36
Abb. 13:	Aufbau des Arbeitsplatzes	37
Abb. 14:	Ligatur der A. carotis communis	38
Abb. 15:	Dünndarm während der Ischämiephase	39
Abb. 16:	A. carotis communis, HE, 20er Objektiv	41
Abb. 17:	Dünndarm, HE, 4er Objektiv	42
Abb. 18:	Dünndarm, HE, 10er Objektiv	42
Abb. 19:	Dünndarm, HE, 40er Objektiv	43

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 20:	A. carotis communis, EvG, 20er Objektiv.....	43
Abb. 21:	Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen im Carotismodell (hEC: n=12; CD34 ⁺ : n=6).....	47
Abb. 22:	Anzahl rollender Zellen bei einem Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen im Carotismodell (hEC: n=12; CD34 ⁺ : n=6).....	47
Abb. 23:	Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich humaner Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen im Carotismodell (hEC: n=12; CD34 ⁺ : n=6).....	48
Abb. 24:	Transient adhärente Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle im Carotismodell (GPVI-aCD133: n=9; GPVI-Fc und aCD133: n=8).....	49
Abb. 25:	Rollende Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle im Carotismodell (GPVI-aCD133: n=9; GPVI-Fc und aCD133: n=8).....	50
Abb. 26:	Adhärente Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle im Carotismodell (GPVI-aCD133: n=9; GPVI-Fc und aCD133: n=8).....	50
Abb. 27:	GPVI-aCD133 vor Ligatur	52
Abb. 28:	GPVI-Fc + aCD133 vor Ligatur	52
Abb. 29:	GPVI-aCD133 5 Minuten nach Ligatur.....	52
Abb. 30:	GPVI-Fc + aCD133 5 Minuten nach Ligatur	52
Abb. 31:	GPVI-aCD133 30 Minuten nach Ligatur.....	52
Abb. 32:	GPVI-Fc + aCD133 30 Minuten nach Ligatur	52
Abb. 33:	Transient adhärente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen bei den Arteriolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34 ⁺ : n=6).....	53

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 34:	Rollende Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen bei den Arteriolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34 ⁺ : n=6).....	54
Abb. 35:	Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen bei den Arteriolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34 ⁺ : n=6).....	54
Abb. 36:	Transient adhärenente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen bei den Venolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34 ⁺ : n=6).....	56
Abb. 37:	Rollende Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen bei den Venolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34 ⁺ : n=6).....	56
Abb. 38:	Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von humanen Endothelzellen mit CD34 ⁺ Progenitorzellen bei den Venolen im Darmmodell (hEC: n=6; CD34 ⁺ : n=6).....	57
Abb. 39:	Transient adhärenente Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle bei den Arteriolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).....	58
Abb. 40:	Rollende Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle bei den Arteriolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).....	59
Abb. 41:	Adhärenente Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle bei den Arteriolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).....	59
Abb. 42:	Transient adhärenente Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle bei den Venolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5).....	61

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 43:	Rollende Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle bei den Venolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5)	61
Abb. 44:	Adhärente Zellen bei einem Vergleich von CD34 ⁺ Progenitorzellen mit GPVI-aCD133 und Kontrolle bei den Venolen im Darmmodell (GPVI-aCD133: n=5; GPVI-Fc und aCD133: n=5)	62
Abb. 45:	GPVI-aCD133 vor Ischämie.....	63
Abb. 46:	GPVI-Fc + aCD133 vor Ischämie	63
Abb. 47:	GPVI-aCD133 10 Minuten nach Reperfusion.....	64
Abb. 48:	GPVI-Fc + aCD133 10 Minuten nach Reperfusion.....	64
Abb. 49:	GPVI-aCD133 60 Minuten nach Reperfusion.....	64
Abb. 50:	GPVI-Fc + aCD133 60 Minuten nach Reperfusion.....	64

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.:	Arteria (lat.)
Abb.:	Abbildung
Abk.:	Abkürzung
ADP:	Adenosindiphosphat
ATP:	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺ :	zweiwertiges Kalzium
CCD:	charged-coupled-device
CD:	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
cDNA:	copy Desoxyribonukleinsäure
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
DCF:	5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate
eEPC:	embryonale Endotheliale Progenitorzellen
EPC:	Endotheliale Progenitorzellen (endothelial progenitor cells)
EvG:	Elastica van Giesson
Fa.:	Firma
g:	relative Zentrifugalbeschleunigung
G-CSF:	granulocyte colony-stimulating factor
GmbH:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP:	Glykoprotein

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HE:	Hämatoxylin-Eosin
hEC:	humane Endothelzellen
HSC:	Hämatopoetische Stammzellen (hematopoietic stem cells)
ICAM:	intercellular adhesion molecule
i. p.:	intraperitoneal
ITAM:	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
i. v.:	intravenös
IVM:	Intravitalmikroskopie
kDa:	Kilodalton
kg:	Kilogramm
KGW:	Körpergewicht
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
MACS:	magnetic affinity cell sorting
min:	Minute
ml:	Milliliter
mg:	Milligramm
MW:	Mittelwert
n:	Anzahl
nm:	Nanometer
NO:	Stickstoffmonoxid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

p:	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS:	phosphat buffered saline
PDGF:	platelet derived growth factor
PECAM:	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PGI ₂ :	Prostazyklin
PLC:	Phospholipase C
PSGL-1:	P-selectin glycoprotein ligand-1
RNA:	Ribonukleinsäure
s:	Sekunde
SD:	Standardabweichung (standard deviation)
SEM:	Standardabweichung der Mittelwerte (standard error mean)
Src-Kinase:	rous sarcoma oncogen kinase (erstmalig in rous sarcoma virus entdeckt)
Syk:	spleen tyrosine kinase
V.:	Vena (lat.)
VCAM:	vascular cellular adhesion molecule
VLA:	very late antigen
vWF:	von-Willebrand-Faktor

12 DANKSAGUNG

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und die wegweisenden Ratschläge, ohne die das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonderes Dankeschön auch an Frau Dr. med. vet. T. Schönberger für die ausgezeichnete Projektbetreuung und die Einführung in die Intravitalmikroskopie. Mit Engagement, Fachkunde und einem stets offenen Ohr für alle Fragen, half sie mir, dieses Projekt zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. H.-G. Rammensee danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 794 (Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse).

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Kolleginnen der Arbeitsgruppe Gawaz für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Frau PD Dr. D. Siegel-Axel danke ich für die Bereitstellung der isolierten humanen Endothelzellen.

Herrn Dr. med. vet. M. Schumm danke ich für die Bereitstellung der hämatopoetischen Stammzellen.

Herrn Dr. H. Bühring gilt ein Dankeschön, dass ich mit dem Antikörper gegen CD133 arbeiten durfte.

Herrn Prof. Dr. G. Jung danke ich für die Herstellung des Konstruktes GPVI-aCD133, das in meiner Arbeit vielfach Anwendung fand.

Ein Dankeschön auch an Herrn Dr. H. Langer für seine aufmunternden Worte und die Überlassung einiger Bilder.

DANKSAGUNG

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau J. Kwiatkowska und Frau C. Neff für die Isolierung der im Mausmodell verwendeten Zellen sowie die Herstellung der Paraffinschnitte bedanken.

Mein Dank gilt auch dem Tierpflegerteam für die verantwortungsvolle und zuverlässige Betreuung unserer Tiere.

Außerdem möchte ich den Mäusen für ihren unermüdlichen, wenn auch nicht ganz freiwilligen Einsatz in der Wissenschaft danken.

Schließlich danke ich meiner Familie sowie meinem Freund Henrik für ihre liebevolle Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir während des Studiums und der Promotion boten.