

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Deutsches Herzzentrum München und
1. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar,
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)**

**Die Rolle von Thrombozyten beim postnatalen
Verschluss des Ductus arteriosus der Maus**

Konstantin Gregor Stark

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.**

**Vorsitzender:
Prüfer der Dissertation:**

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

- 1. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg**
- 2. Priv.-Doz. Dr. I. V. Deisenhofer**
- 3. Univ.-Prof. Dr. J. Hess, Ph.D.**

**Die Dissertation wurde am 29.6.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.4.2012 angenommen.**

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Verzeichnis der Abkürzungen | VI |
| 2 | Einleitung | 1 |
| 2.1 | Prä- und postnatale Entwicklung des Ductus arteriosus | 2 |
| 2.1.1 | Embryologie und fetale Entwicklung des Ductus arteriosus | 2 |
| 2.1.1.1 | Embryologie des Ductus arteriosus | 2 |
| 2.1.1.2 | Physiologie der fetalen Zirkulation | 2 |
| 2.1.1.3 | Morphologie des fetalen Ductus arteriosus | 4 |
| 2.1.2 | Physiologie und Morphologie des postnatalen Verschlusses | 5 |
| 2.1.2.1 | Funktioneller Verschluss | 5 |
| 2.1.2.2 | Anatomischer Verschluss | 6 |
| 2.1.3 | Der persistierende Ductus arteriosus | 7 |
| 2.2 | Die Rolle von Thrombozyten bei arterieller Thrombose | 9 |
| 2.2.1 | Thrombozytenadhäsion - Glykoprotein Ib-IX-V und vWF | 10 |
| 2.2.2 | Thrombozytenaktivierung - Glykoprotein VI | 11 |
| 2.2.3 | Thrombozytenaggregation | 12 |
| 2.2.3.1 | Integrine der Thrombozyten | 12 |
| 2.2.3.2 | Glykoprotein IibIIIa | 13 |
| 2.2.4 | Mausmodelle | 14 |
| 2.2.4.1 | Mausmodell der Thrombozytopenie | 14 |
| 2.2.4.2 | Mausmodell der Glanzmann Thrombasthenie | 15 |
| 2.2.4.3 | Das anti-GPVI behandelte Mausmodell | 16 |
| 2.2.5 | Interaktionen von Thrombozyten und Progenitorzellen | 17 |
| 2.3 | Neointimaentstehung | 19 |
| 2.3.1 | Pathophysiologie und Histologie der Neointimaformation | 20 |
| 2.3.2 | Rolle von Chemokine bei der Neointimabildung | 22 |
| 2.3.2 | Rolle von Vorläuferzellen bei der Neointimabildung | 23 |
| 3 | Problemstellung | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4 | Material und Methoden | 28 |
| 4.1 | Vorbemerkungen und Versuchsplan | 28 |
| 4.2 | Versuchstiere | 29 |
| 4.3 | Entnahme des Ductus arteriosus | 30 |
| 4.4 | Präparation des Ductus arteriosus | 30 |
| 4.4.1 | Anfertigung von Paraffinpräparaten | 30 |
| 4.4.2 | Anfertigung von Gefrierpräparaten | 32 |
| 4.5 | Hämatoxylin-Eosin Färbung des Ductus arteriosus | 32 |
| 4.6 | Immunhistologie | 33 |
| 4.6.1 | Die ABC-Methode | 34 |
| 4.6.1.1 | CD41 | 34 |
| 4.6.1.2 | von Willebrand Faktor | 34 |
| 4.6.1.3 | Fibrin/Fibrinogen | 35 |
| 4.6.1.4 | Flk-1 | 35 |
| 4.6.2 | Die LSAB-Methode – CD45 | 35 |
| 4.7 | Immunfluoreszenz | 36 |
| 4.7.1 | Ki67, c-kit, CD34, Sca-1 und CD133 | 37 |
| 4.7.2 | SDF-1 | 37 |
| 4.7.3 | CXCR4 | 38 |
| 4.7.4 | Kollagen Typ I | 38 |
| 4.7.5 | ABCG-2 und sm-Aktin | 39 |
| 4.7.6 | VE-Cadherin, CD31 und CD41 | 39 |
| 4.7.7 | Doppelfärbung CD34-Ki67 | 40 |
| 4.7.8 | Doppelfärbung CD34-c-kit | 40 |
| 4.7.9 | Doppelfärbung CD34-ABCG-2 | 40 |
| 4.7.10 | Doppelfärbung CD34-VE-Cadherin und CD31-VE-Cadherin | 40 |
| 4.7.11 | Doppelfärbung CD41-SDF-1 | 40 |
| 4.8 | Zellzahl der Intima und Proliferationsverhalten | 41 |
| 4.8.1 | Untersuchung des intimalen Proliferationsverhaltens | 42 |
| 4.8.2 | Statistische Auswertung | 42 |
| 4.9 | Angiographie des Ductus arteriosus | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 4.10 Laser-Mikrodissektion | 43 |
| 4.10.1 Prinzip der Laser-Mikrodissektion | 43 |
| 4.10.2 Aufbau des Arbeitsplatzes | 44 |
| 4.10.3 Versuchsdurchführung | 44 |
| 4.10.4 Auswertung der Proben mittels rtPCR | 46 |
| | |
| 5 Ergebnisse | 48 |
| <hr/> | |
| 5.1 Mechanismus der Thrombusbildung im Ductus arteriosus | 48 |
| 5.1.1 Histologie des Verschlusses des Ductus arteriosus | 48 |
| 5.1.2 Thrombozyten und Substrate der Thrombusbildung | 49 |
| 5.2 Einfluss von Thrombozyten auf Verschluss und Zellzahl des Ductus arteriosus | 52 |
| 5.2.1 Erhöhte Inzidenz des PDA bei Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion | 52 |
| 5.2.2 Morphologie des Ductus arteriosus beim GpIIb ^{-/-} , GPVI-Antikörper und NF-E2 ^{-/-} Modell | 54 |
| 5.2.3 Reduzierung der neointimalen Zellzahl im GpIIb ^{-/-} , GPVI-Antikörper und NF-E2 ^{-/-} Modell | 56 |
| 5.2.4 Reduzierung der Proliferationsrate im GPIIb ^{-/-} Modell | 57 |
| 5.3 Charakterisierung des intimalen Remodellings im Ductus arteriosus | 58 |
| 5.3.1 SDF-1/CXCR4 Expression im Ductus arteriosus | 58 |
| 5.3.2 Expression von Oberflächenmarkern und Proliferation im Rahmen des intimalen Remodellings | 62 |
| | |
| 6 Diskussion | 68 |
| <hr/> | |
| 6.1 Diskussion von Material und Methoden | 69 |
| 5.1.1 Versuchstiere | 69 |
| 5.1.2 Histologie | 70 |
| 5.1.3 Immunhistologie und Immunfluoreszenz | 71 |
| 5.1.4 Laser-Mikrodissektion und PCR | 71 |

| | |
|---|-------------------|
| 6.2 Diskussion der Ergebnisse | 72 |
| 6.2.1 Faktoren und Verlauf der Thrombusbildung beim postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus | 72 |
| 6.2.2 Einfluss von Thrombozyten auf Verschluss und Remodelling des Ductus arteriosus | 75 |
| 6.2.3 Beteiligung der SDF-1/CXCR4-Achse am Verschluss des Ductus arteriosus | 77 |
| 6.2.4 Identifizierung einer Zellpopulation mit Charakteristika von Progenitorzellen im Lumen des Ductus arteriosus | 79 |
| | |
| 6.3 Ausblick | 82 |
| | |
| <u>7 Zusammenfassung</u> | <u>83</u> |
| | |
| <u>8 Summary</u> | <u>84</u> |
| | |
| <u>9 Literaturverzeichnis</u> | <u>85</u> |
| | |
| <u>10 Tabellenverzeichnis</u> | <u>112</u> |
| | |
| <u>11 Abbildungsverzeichnis</u> | <u>113</u> |
| | |
| <u>12 Danksagung</u> | <u>115</u> |

1 Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-----------|---|
| ABC | Avidin-Biotin-Complex |
| ABCG-2 | ATP-Binding Cassette transporter subfamily G member 2 |
| ADAMTS | A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motif |
| ADP | Adenosin Diphosphat |
| alpha-SMA | alpha Smooth Muscle Actin |
| Apo E | Apolipoprotein E |
| ATP | Adenosin Triphosphat |
| bFGF | basic fibroblast growth factor, |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| cAMP | cyclisches Adenosin Monophosphat |
| CCL2 | Chemokine Ligand 2 |
| CCR2 | Chemokine Receptor 2 |
| CD | Cluster of differentiation |
| cm | centimeter |
| COX | Cyclooxygenase |
| CSF | Colony Stimulating Factor |
| CXCR1 | Chemokine Receptor 1 |
| CXCR4 | Chemokine Receptor 4 |
| DA | Ductus arteriosus |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidine |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| Fc | fragment crystallizable |
| FELASA | Federation of European Laboratory Animal Science Associations |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate |
| Flk-1 | Fetal liver kinase 1 |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GP | Glykoprotein |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HIF-1 | Hypoxia Inducible Factor 1 |
| HRP | Horse Radish Peroxidase |
| Ig | Immunglobulin |
| IGF-1 | Insulin-like Growth Factor 1 |
| IL-1 | Interleukin |
| ITAM | Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif |
| kDa | kilo Dalton |
| LCM | Laser capture Microdissection |
| L.e.i. | Lamina elastica interna |
| LFA-1 | Lymphocyte Function-Associated antigen-1 |
| LPC | Laser Pressure Catapulting |
| LSAB | Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode |
| Mac-1 | Macrophage adhesion molecule-1 |
| MCP-1 | Monocyte Chemotactic Protein-1 |
| µl | microliter |
| mg | miligramm |
| ml | mililiter |
| mmHg | milimeter Quecksilber |
| MMP | Matrix Metallo Proteinase |
| NF-E2 | Nuclear Factor Erythroid-derived 2 |
| NO | Nitric Oxide |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |

| | |
|-------------|--|
| PE | Phycoerythrin |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| PGI2 | Prostaglandin I2 |
| PSGL-1 | P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 |
| RANTES | Regulated Upon Activation Normal T-Cell Expressed And Secreted |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| RNAse | Ribonuclease |
| rtPCR | reverse transcription Polymerase Chain Reaction |
| Sca-1 | Stem cell antigen 1 |
| SDF-1 | Stromal Cell derived Factor-1 |
| SM2 | Smooth Muscle myosin heavy chain-2 |
| sm-Aktin | smooth muscle Aktin |
| Syk | Spleen tyrosine kinase |
| TBS | Tris-Buffered Saline |
| TGF-beta | Transforming Growth Factor-beta |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TxA2 | Thromboxan A2 |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule 1 |
| VE-Cadherin | Vascular Endothelial Cadherin |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VLA-4 | Very Late Antigen-4 |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| wt | wildtype |

2 Einleitung

Der Ductus arteriosus stellt im fetalen Blutkreislauf einen rechts-links Shunt zwischen Truncus pulmonalis und Aorta dar. Er leitet den Großteil des rechtsventrikulären Schlagvolumens an der unbelüfteten Lunge vorbei in die Aorta descendens. Der Verschluss des Ductus arteriosus innerhalb weniger Stunden nach der Geburt ist essentiell für die postnatale Kreislaufadaptation des Neugeborenen. Persistiert ein offener Ductus arteriosus nach der Geburt, so kommt es infolge der veränderten Druckverhältnisse im großen Kreislauf zu einer Shuntumkehr. Dies führt zu einer Belastung von Lungenkreislauf und linkem Herzen, was wiederum mit einer beträchtlichen Morbidität und Mortalität assoziiert ist (Hermes-DeSantis 2006). Die Inzidenz des persistierenden Ductus arteriosus (PDA) weist eine inverse Korrelation zum Gestationsalter auf, sodass bis zu 60% der Frühgeborenen die vor der 28. Schwangerschaftswoche zur Welt kommen diese Fehlbildung aufweisen (Van Overmeire 2005). Damit stellt der PDA die häufigste kardiovaskuläre Entwicklungsstörung Frühgeborener und die dritthäufigste angeborene Herzerkrankung des Menschen allgemein dar. Durch die erhöhten Überlebensraten Frühgeborener hat auch die Inzidenz des PDA in den letzten zwei Jahrzehnten stark zugenommen (Hoffman 2002). Trotz intensiver Forschung zur medikamentösen Therapie ist diese nicht immer erfolgreich, sodass beim symptomatischen PDA in einigen Fällen ein interventioneller Verschluss durchgeführt werden muss (Schneider 2006). Da Frühgeborene mit PDA trotz medikamentöser und chirurgischer Intervention eine deutlich erhöhte Mortalität aufweisen, ist es von zentraler Bedeutung, die Mechanismen des Verschlusses sowie die zellulären Vorgänge näher zu untersuchen, um frühzeitig Risikofaktoren erkennen und sinnvolle Therapiekonzepte entwickeln zu können.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb die zellulären Vorgänge bei Verschluss und Remodelling des Ductus arteriosus genauer analysiert werden. Da die wesentlichen Schritte des funktionellen und anatomischen Verschlusses bei der Maus in den ersten 24 Stunden post partum ablaufen, wird dieser Zeitraum einer besonders eingehenden Betrachtung unterzogen. Dabei wird vor allem auf die Rolle der Thrombozyten eingegangen, von denen bekannt ist, dass sie im Rahmen des Gefäßremodelling und pathologischer Gefäßverschlüsse eine wichtige Rolle spielen.

2.1 Prä- und postnatale Entwicklung des Ductus arteriosus

2.1.1 Embryologie und fetale Entwicklung des Ductus arteriosus

2.1.1.1 Embryologie des Ductus arteriosus

In der embryonalen Entwicklung unterscheidet sich der Ductus arteriosus von der Angiogenese anderer Arterien des Ausflusstraktes (Bergwerff 1999). Er entwickelt sich aus dem linken distalen Anteil des sechsten Aortenbogens (de Ruiter 1989). Zur Bildung der Gefäßwand trägt die Einwanderung von Neuralleistenzellen aus dem Bereich des 1. bis 3. Somiten maßgeblich bei, die auch am kardialen Ausflusstrakt beteiligt sind (Fukiishi 1992). Im Gegensatz zu den umgebenden Arterien vom elastischen Typ, weist der Ductus arteriosus phänotypische Merkmale einer Arterie vom muskulären Typ auf (Gittenberger-De Groot 1985). Bei der Maus ist der Elastingehalt zwar vergleichbar zur Aorta, doch ergeben sich Unterschiede in der Konfiguration der Fibrillen (Hornblad 1967a). Auch die Differenzierung der glatten Muskelzellen der Media ist im Vergleich zu den umgebenden Arterien fortgeschritten. Dies wird reflektiert durch die erhöhte Expression von heavy-Caldesmon und Calponin (Kim 1993)(Slomp 1997). Zudem weist der Ductus arteriosus beim Kaninchen im Vergleich zur Aorta mehr Myofilamente in den glatten Muskelzellen auf und exprimiert SM2, einen Myosin-schwere-Ketten-Isotyp, der in allen anderen Gefäßen erst postnatal exprimiert wird (Kim 1993).

2.1.1.2 Physiologie der fetalen Zirkulation

Im fetalen Kreislauf stellt der Ductus arteriosus einen rechts-links Shunt zwischen Truncus pulmonalis, nahe dem Abgang der linken Pulmonalarterie, und Aorta descendens nach Abgang der linken Arteria subclavia dar (siehe Abb. 1). Die Strömungsrichtung wird durch den Druckunterschied zwischen systemischer und pulmonaler Zirkulation bestimmt. Der systemische Kreislauf weist durch die umbilico-plazentare Zirkulation einen niedrigen Blutdruck auf, während im pulmonalen Kreislauf wegen der noch nicht belüfteten Lunge ein hoher Blutdruck herrscht, sodass ein rechts-links Shunt entsteht (Anderson 1981)(Heymann 1975). Man geht davon aus, dass beim Lamm etwa 10% des rechtsventrikulären Schlagvolumens in den Lungenkreislauf und 90% durch den Ductus arteriosus in die Aorta gelangen (Anderson 1981).

Die Aufrechterhaltung der Durchgängigkeit des Ductus arteriosus in utero ist ein aktiver Prozess. Das Gefäß weist einen intrinsischen Tonus auf, der durch vasodilatatorische Mechanismen inhibiert wird (Kriska 1990). Dabei kommt insbesondere zirkulierenden Prostaglandinen eine Schlüsselrolle zu. Der Ductus arteriosus selbst produziert vor allem

PGI₂, das aber weniger vasodilatatorische Potenz hat als das zirkulierende PGE₂ (Coceani 1978)(Pace-Asciak 1983). Die starke vasodilatatorische Potenz des zirkulierenden PGE₂ wird durch die PGE-Rezeptoren EP₂ und EP₄ vermittelt, welche in der Gefäßwand des Ductus arteriosus exprimiert werden. Die Bindung von PGE₂ an diese Rezeptoren führt zum Anstieg des intrazellulären cAMP. Dies wiederum senkt die intrinsisch hohe Sensitivität der kontraktilen Proteine im Ductus arteriosus für Calcium (Crichton 1997). Die zentrale Rolle der Prostaglandine wird auch durch die Fähigkeit von COX-Inhibitoren wie Indomethacin belegt, die sowohl in utero als auch postnatal eine Vasokonstriktion des Ductus arteriosus auslösen können (Takahashi 2000).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der niedrige Sauerstoff Partialdruck im fetalen Blut, der bei 18-28 mmHg liegt (Anderson 1981)(Heymann 1975). Dadurch werden Kalium-Kanäle offen gehalten und die glatten Muskelzellen sind hyperpolarisiert (Coceani 1989)(Michelakis 2000). Durch den postnatalen Anstieg des Sauerstoff-Partialdrucks wird ein Cytochrom P450 Hämoprotein aktiviert, sodass die Kalium-Kanäle schließen und die Zellmembran depolarisiert wird. Dies wiederum löst einen Calcium-Einstrom aus, was die Kontraktion der glatten Muskelzellen zur Folge hat (Nakanishi 1993).

Weiterhin ist NO bei Nagern im frühen Gestationsalter für die Aufrechterhaltung der Durchgängigkeit des Ductus arteriosus anscheinend von Bedeutung (Momma 1999). So kann die endotheliale NO-Synthase (eNOS) im Endothel und in den Vasa vasorum des Ductus arteriosus nachgewiesen werden. In vivo führen NO-Donatoren zu einer Dilatation, NO-Synthase-Inhibitoren dagegen zu einer Kontraktion des Ductus arteriosus (Fox 1996)(Walsh 1988). Auch Kohlenmonoxid wird im Ductus arteriosus synthetisiert und hat einen dilatatorischen Effekt auf die Gefäßmuskulatur (Coceani 1997). NO und Kohlenmonoxid haben aber im Vergleich zu Prostaglandinen und Sauerstoff eine untergeordnete Bedeutung.

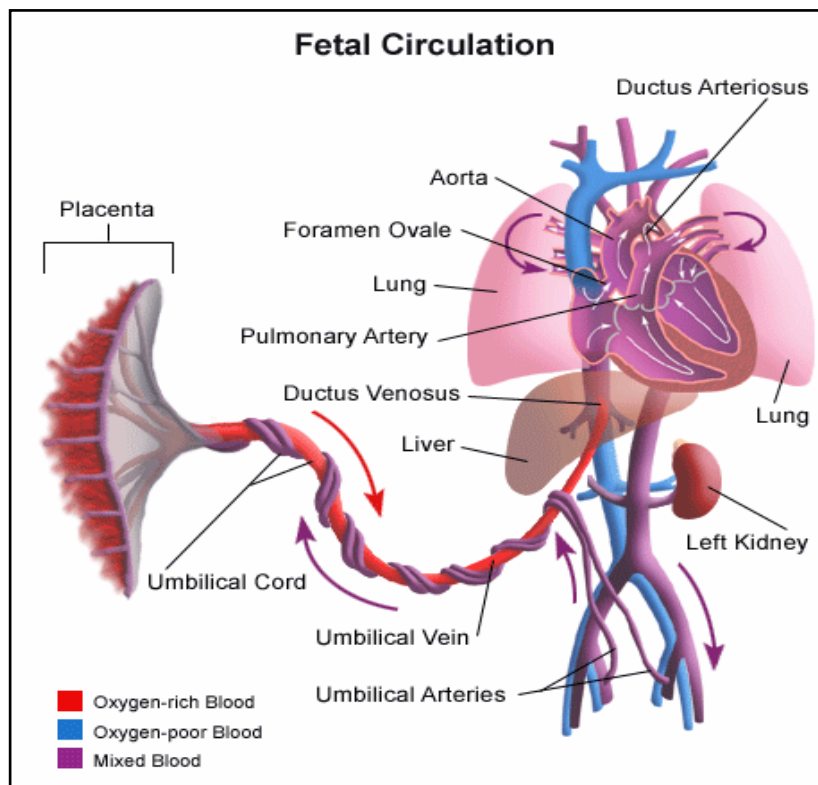


Abbildung 1: Schematische Darstellung der fetalen Kreislaufsituation

Sauerstoffreiches Blut gelangt von der Plazenta über die Nabelvene und den Ductus venosus in den rechten Vorhof. Durch das offene Foramen ovale wird das Blut in den linken Ventrikel geleitet und von dort in den systemischen Kreislauf zur Versorgung des Gehirns und der oberen Extremitäten. Das Blut aus dem rechten Ventrikel wird großteils an der unbelüfteten Lunge vorbei über den Ductus arteriosus in die Aorta descendens geleitet. Damit stellt der Ductus arteriosus in der fetalen Zirkulation einen rechts-links Shunt dar.

2.1.1.3 Morphologie des fetalen Ductus arteriosus

Morphologisch ist der Ductus arteriosus wie jedes andere Gefäß aus einer Tunica intima, Tunica media und Adventitia aufgebaut. Bei der Maus besteht die Intima bis zum 16. Gestationstag aus einer einlagigen Endothelschicht. Ab dem 17. Gestationstag kann bereits eine zweite Zellschicht beobachtet werden, also zum Ende der Gestationszeit, die bei der Maus in der Regel 18,5 Tage nach Verpaarung andauert. Hierbei kommt es zu einer Ablösung der Endothelzellen von der Lamina elastica interna. Die Lamina elastica interna selbst wird in mehrere Lagen aufgespalten (Tada 1990). Im neu entstandenen subendothelialen Raum sammelt sich extrazelluläre Matrix an, wodurch es glatten Muskelzellen aus der Media ermöglicht wird, diesen Raum zu invadieren (Slomp 1992). Die Zellen des subendothelialen Raumes weisen Charakteristika undifferenzierter Zellen auf und exprimieren während der Fetalzeit und frühen Neugeborenenperiode kaum Myofilamente (Hornblad 1967b). Die dadurch hervorgerufene Intimaverdickung wird als wichtiger Faktor für den postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus angesehen (Gittenberger-De Groot 1980b). Die Media weist

alternierende Schichten von Laminae elasticae und glatten Muskelzellen auf, die sich ultrastrukturell als reife Muskelzellen darstellen. Ab dem 16. Gestationstag bilden sich zunehmend mehr Myofilamente aus (Tada 1990). All diese Prozesse stellen anscheinend eine pränatale Vorbereitung auf den bevorstehenden postnatalen Verschluss dar (Tada 1985).

2.1.2 Physiologie und Morphologie des postnatalen Verschlusses

Der postnatale Verschluss des Ductus arteriosus wird generell in zwei Phasen unterteilt. Der funktionelle Verschluss wird durch die Kontraktion der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand hervorgerufen. Durch diese Vasokonstriktion wird das Lumen bereits stark verkleinert. Doch erst die zweite Phase, der anatomische Verschluss, führt zur permanenten Obliteration des Lumens. Dieser ist durch komplexe Remodellingprozesse im gesamten Gefäß, insbesondere jedoch der Intima gekennzeichnet. Dabei weisen diese Vorgänge Ähnlichkeiten zu pathologischen Gefäßveränderungen auf, wie sie bei der Atheroskleroseentstehung und Neointimabildung nach Gefäßverletzung zu beobachten sind (Clyman 2006)(Slomp 1992)(Waleh 2005).

2.1.2.1 Funktioneller Verschluss

Der funktionelle Verschluss wird durch die Kontraktion glatter Muskelzellen in der Gefäßwand des Ductus arteriosus hervorgerufen, wobei er bei der Maus vom aortalen zum pulmonalen Ende des Gefäßes hin verläuft. Nach drei Stunden ist das Lumen bei der Maus vollständig verschlossen. Der wichtigste Auslöser für die Vasokonstriktion ist der Wegfall vasodilatatorischer Mechanismen der Fetalperiode. Weiterhin wird der postnatale Ductus arteriosus sensitiver für vasokonstriktorische Mediatoren, da die synergistische Inhibition durch die hohe PGE₂-Konzentration und die niedrige Sauerstoffspannung während der Fetalperiode verloren geht. So reagiert das Gefäß unter fetaler Sauerstoffspannung und PGE₂-Konzentration nur in sehr geringem Maße selbst auf micromolare Dosen von Noradrenalin (Smith 1991).

In der Postnatalperiode vermittelt die Erhöhung der Sauerstoffspannung über Depolarisation und Calciumeinstrom in die glatten Muskelzellen die initiale Kontraktion der Gefäßmuskulatur. Diese nimmt ein wesentlich höheres Ausmaß an als die physiologisch zu beobachtende Reaktion normaler Arterien auf einen Anstieg der Sauerstoffspannung (Smith 1988). Weiterhin kommt es zu einem starken Abfall der zirkulierenden PGE₂-Konzentration, beim Lamm auf ein Zwanzigstel der fetalen Ausgangskonzentration (Clyman 1980). Dies wird sowohl durch die erhöhte pulmonale Perfusion, durch die Prostaglandine vermehrt

metabolisiert werden, als auch durch den Wegfall der Plazenta erklärt, die die wichtigste Quelle für zirkulierende Prostaglandine ist (Clyman 1981)(Lytton 1982). Wird dem Neugeborenen im Gegensatz dazu unmittelbar nach der Geburt PGE₂ verabreicht, so kann dies den Verschluss des Ductus arteriosus verhindern. Dies stellt bei einigen angeborenen Herzfehlern eine lebensrettende Maßnahme dar (Jarkovska 1992). Der postnatale Abfall der PGE₂-Konzentration hat eine Vasokonstriktion des Ductus arteriosus zur Folge, wodurch es zur Hypoxie der Media kommt. Dadurch wird auch die lokale Produktion von Prostaglandinen und NO inhibiert. Durch den Wegfall dieser dilatatorischen Stimuli wird der Verlust der durch Sauerstoff vermittelten Vasokonstriktion kompensiert, sodass sich der Ductus auch unter hypoxischen Bedingungen nicht mehr relaxiert (Kajino 2000). Der Ductus arteriosus verfügt allerdings auch über zwei Prostaglandin-Rezeptoren, die eine Kontraktion der Gefäßwand vermitteln. Die Stimulation des Thromboxan Rezeptors und des PGE-Rezeptors EP3 durch Agonisten führt zur starken Vasokonstriktion (Smith 1995).

Nach der Geburt bewirkt das Zusammenspiel aller genannten Mechanismen eine Kontraktion der Gefäßwand, durch die der Durchmesser der Media stark zunimmt und es zur Hypoperfusion der Vasa vasorum kommt (Tada 1990)(Kajino 2002). Dies hat zur Folge, dass die gesamte Media zur avaskulären Zone wird, da sich dadurch die Diffusionsstrecke zu versorgenden Blutgefäßen stark vergrößert. Bei noch erhaltenem luminalen Blutfluss führt dies beim reifen Neugeborenen zu einer Hypoxie der Media (Kajino 2002). Bei kleineren Tieren wie der Maus spielt die Hypoperfusion der Vasa vasorum allerdings keine Rolle, da sie wie das menschliche Frühgeborene über keine Vasa vasorum verfügen. Hier ist die Obliteration des luminalen Blutflusses der entscheidende Faktor für die Entwicklung der Mediahypoxie (Wolinsky 1967).

2.1.2.2 Anatomischer Verschluss

Die Entwicklung der Mediahypoxie scheint den entscheidende Stimulus für den darauf folgenden anatomischen Verschluss des Ductus arteriosus darzustellen, welcher schließlich zur irreversiblen Obliteration des Lumens führt (Clyman 1999)(Kajino 2001)(Seidner 2001). Dabei spielt das Remodelling der Intima eine wichtige Rolle, wobei es zu Veränderungen der glatten Muskelzellen, Endothelzellen und extrazellulären Matrix kommt (Broccoli 1973). Durch die Mediahypoxie werden wichtige Faktoren für die Neointimabildung wie VEGF und TGF-beta induziert (Clyman 2006). Sowohl VEGF als auch TGF-beta triggern die Migration und Proliferation intimaler Zellen (Celletti 2001)(Leung 1989)(Massague 1987). Wird VEGF inhibiert, so hat dies eine Beeinträchtigung des intimalen Remodellings zur Folge, wobei die

Proliferation intimaler Zellen maßgeblich reduziert ist (Clyman 2002a). Als Stimulus für die Migration glatter Muskelzellen im Ductus arteriosus wird auch PDGF aus adhärierenden Thrombozyten diskutiert (Tannenbaum 1996). Zudem führt Hypoxie und Nährstoffentzug zur Apoptose glatter Muskelzellen in der Media des Ductus arteriosus (Levin 2005). Reicht der Grad der Hypoxie nicht zur Apoptoseinduktion aus, so bleibt auch die vermehrte Expression von VEGF und Endothelzellproliferation aus, wodurch es zu einem hohen Prozentsatz zur Wiedereröffnung des Ductus arteriosus kommt (Clyman 1999).

Den Endothelzellen kommt beim intimalen Remodelling im Ductus arteriosus eine wichtige Rolle zu, da ihre Proliferation und Migration unter Beteiligung von Faktoren wie VEGF induziert wird (Clyman 1999)(Plate 1993). Zudem kommt es nach erfolgtem funktionellem Verschluss zur Veränderung des Phänotyps der luminalen Endothelzellen. Das Muster der Integrinexpression entspricht postnatal dem von wachsenden kapillären Endothelzellen, was eine wichtige Voraussetzung für die Neointimabildung darstellt (Clyman 1996). Weiterhin werden von intimalen Zellen auch Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 oder E-Selektin exprimiert, was als eine Aktivierung des Endothels verstanden werden kann. Auch inflammatorische Mediatoren wie Interleukin 8 und 6, macrophage CSF-1, CD 154, Interferon-gamma und TNF-alpha werden vermehrt exprimiert, die auch im Rahmen des atherosklerotischen Gefäßremodellings zu finden sind. Zudem kommt es zur Rekrutierung von T-Zellen und CD68⁺/CD14⁺ mononukleären Zellen. Dies deutet darauf hin, dass auch eine inflammatorische Reaktion am Remodelling des Ductus arteriosus beteiligt ist (Waleh 2005).

Im weiteren Verlauf entwickeln sich im obliterierten Lumen des Ductus arteriosus glatte Muskelzellen (Tada 1990). Bei der Maus weisen viele Zellen der Intima innerhalb von 24 Stunden post partum Myofilamente auf. Innerhalb von drei Wochen entwickeln sich hier Zellen, die Charakteristika reifer glatter Muskelzellen aufweisen. Die Anzahl der Zellen in Media und Intima nimmt mit der zunehmenden Kollagen- und Elastinablagerung innerhalb der 8. bis 16. postnatalen Woche zunehmend ab. Schließlich stellt sich der Ductus arteriosus nur noch als bindegewebige Struktur dar (Tada 1990).

2.1.3 Der persistierende Ductus arteriosus

Die Inzidenz des persistierenden Ductus arteriosus hat in den letzten zwanzig Jahren durch die verbesserten Überlebensraten Frühgeborener stark zugenommen (Hoffman 2002). Bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht zwischen 501g und 1500g liegt die Inzidenz bei 31% (The Vermont-Oxford Trials Network 1993). Bei termingerecht Geborenen liegt sie bei

1:2000 Geburten. Insgesamt macht der persistierende Ductus arteriosus 5-10 % der angeborenen Herzfehler aus (Mitchell 1971). Als wichtigster Risikofaktor gilt somit die Frühgeburtlichkeit, aber auch genetische Faktoren wie Chromosomenaberrationen und seltene erbliche Syndrome wie das Carpenter und Holt Oram Syndrom können einen PDA hervorrufen (Schneider 2006). Weiterhin ist eine Rötelninfektion im ersten Trimenon der Schwangerschaft mit einem hohen Risiko für einen persistierenden Ductus arteriosus assoziiert (GIBSON 1952). Histologisch stellt dieser Ductus arteriosus ein sehr unreifes Entwicklungsstadium dar (Gittenberger-De Groot 1980a).

Pathophysiologisch führen die veränderten Druckverhältnisse im systemischen und pulmonalen Kreislauf zur Shuntumkehr, sodass zunächst ein links-rechts Shunt entsteht (siehe Abb. 2). Dies führt einerseits zu einer Volumenbelastung des linken Herzens und der Lunge (Schneider 2006). Andererseits ist beim Neugeborenen ein peripherer Volumenmangel mit erhöhtem Risiko für intraventrikuläre Blutungen, nekrotisierende Enterokolitis, bronchopulmonale Dysplasie und Tod zu beobachten (Cotton 1978)(Gersony 1983). Langfristig kommt es durch den PDA zu einer Eisenmangel Reaktion mit Steigerung des pulmonalen Blutdrucks bis hin zur irreversiblen Shuntumkehr (Espino-Vela 1968). Kardial bewirkt die chronische Volumenbelastung häufig bis zur dritten Lebensdekade die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Campbell 1968).

Bei Frühgeborenen reicht der Grad der Vasokonstriktion häufig nicht aus um das nötige Maß an Hypoxie zu erzeugen, das nötig wäre, um den anatomischen Verschluss des Ductus arteriosus zu induzieren. Da das unreife Gefäß noch nicht über Vasa vasorum verfügt, ist die Entstehung der Hypoxie allein von der Obliteration des luminalen Flusses abhängig (Narayanan 2000). Die Dickenzunahme der Gefäßwand entspricht nur einem Drittel der Dickenzunahme beim reifen Neugeborenen. Dadurch finden die entscheidenden Prozesse der Neointimabildung nicht statt. Bei Frühgeborenen kommt es wesentlich seltener zur Apoptose glatter Muskelzellen, Expression von VEGF und Proliferation luminaler Endothelzellen (Clyman 1999). Wird beim Frühgeborenen in der frühen postnatalen Phase die Prostaglandin- und NO-Synthese inhibiert, so entwickelt auch er ein ausreichendes Maß an Hypoxie in der Gefäßwand, um die oben genannten Prozesse der Neointimabildung zu induzieren (Seidner 2001). Daher gilt der Prostaglandin-Synthese-Inhibitor Indomethacin als Therapie der Wahl für den hämodynamisch relevanten persistierenden Ductus arteriosus (Nadas 1981).

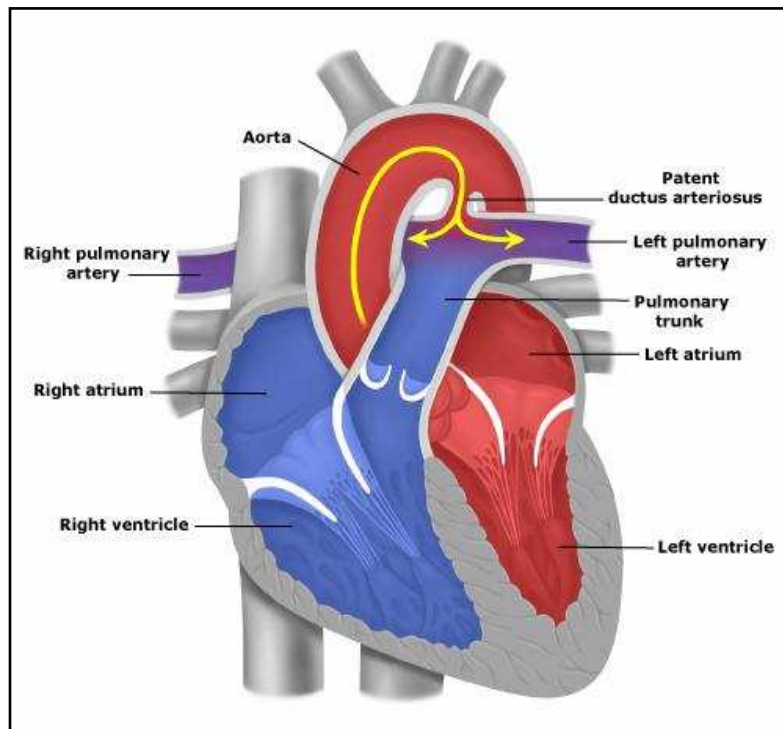


Abbildung 2: Kreislaufverhältnisse beim persistierenden Ductus arteriosus

Durch die postnatalen Veränderungen der Blutdruckverhältnisse kommt es beim persistierenden Ductus arteriosus zur Shuntumkehr. Der nun vorliegende links-rechts Shunt führt zur Belastung des Lungenkreislaufs sowie des linken Herzens.

2.2 Die Rolle von Thrombozyten bei arterieller Thrombose

Die Hauptfunktion der Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung der Integrität des Gefäßsystems und die Unterbindung des unregelmäßigen Blutaustrittes. Sie entstehen durch die Abschnürung von Megakaryozyten (Junt 2007) und zirkulieren für 7 bis 10 Tage im Blut. Dort sind sie unter physiologischen Bedingungen in einer Anzahl von 150.000-300.000/ μl als 2-4 μm große Blutbestandteile zu finden (George 2000).

Unter pathologischen Bedingungen sind sie nicht nur entscheidender Bestandteil okkludierender arterieller Thromben, die im Rahmen des Myokardinfarkts oder ischämischen Hirninfarkts zum Gefäßverschluss führen, sondern sind auch in vielfältiger Weise am pathologischen Gefäßremodelling beteiligt (Ruggeri 2002). So konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten bereits in frühen Phasen des atherosklerotischen Remodellings an dysfunktionales Endothel adhären (Massberg 2002)(Massberg 2005)(Gawaz 2006). Nach Adhäsion und Aktivierung sezernieren sie eine Reihe von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, wodurch sie die Rekrutierung von Leukozyten und hämatopoietischen Progenitorzellen vermitteln sowie die Migration und Proliferation sessiler Muskelzellen unterstützen (Massberg 2006)(Schober 2002)(Schwartz 1997)(Stellos 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird geprüft, inwiefern Thrombozyten für das physiologische Gefäßremodelling des Ductus arteriosus von Bedeutung sind. Im folgenden werden daher die Thrombozyten vermittelten Prozesse in der Pathogenese des inflammatorischen Gefäßumbaus dargestellt. Zudem werden die wichtigsten Abläufe der Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation beschrieben, mit dem Hauptfokus auf den beteiligten thrombozytären Glykoproteinen.

2.2.1 Thrombozytenadhäsion - Der Glykoprotein Ib-IX-V Komplex und vWF

Die Adhäsion der Thrombozyten an einer Gefäßverletzung führt dazu, dass diese durch einen Monolayer aus aktivierten Thrombozyten bedeckt wird (siehe Abb. 3). Als Trigger hierfür gilt die Freilegung thrombogener Materialien des subendothelialen Raumes und der Gefäßwand, insbesondere Kollagen und von Willebrand Faktor (vWF). Die wichtigsten beteiligten Mechanismen sind die Bindung des thrombozytären GPIb-IX-V Komplexes an vWF und von GPVI an Kollagen (Ruggeri 2002). Funktionell ist der Glykoprotein Ib-IX-V Komplex verantwortlich für die initiale Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand, da er für die Ligandenbindung keiner Aktivierung bedarf (Ruggeri 2002). Dabei kommt der Interaktion von GPIb-alpha mit der A1 Domäne des auf Kollagen immobilisierten vWF eine Schlüsselrolle zu (Savage 1996). Hierdurch wird das initiale Tethering der Thrombozyten vermittelt, was die Interaktion weiterer Rezeptoren mit thrombogenen Oberflächen ermöglicht (Savage 1998). Desweiteren spielt die Interaktion von GPIb-alpha mit vWF eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Thrombozyten an aktiviertem Endothel bei noch erhaltener Integrität der Gefäßwand (Massberg 2002). Dies wird vor allem durch die Bindung von GpIb-alpha an vWF und P-Selektin ermöglicht, welche von aktivierten Endothelzellen an der Oberfläche präsentiert werden (Andre 2000)(Frenette 1995).

Der Glykoprotein Ib-IX-V Komplex stammt aus der Familie der Leucine-rich-repeat Proteine. Er ist in einer hohen Dichte mit einer Anzahl von 25.000 Kopien pro Thrombozyt zu finden (Berndt 2001). GpIb-alpha besitzt an seiner N-terminalen Domäne Bindungsstellen für vWF, Thrombin (Takamatsu 1986), Gerinnungsfaktoren XI/XIIa (Baglia 2002)(Bradford 2000) und High-molecular-weight Kininogen (Bradford 1997). Weiterhin bindet der GPIb-IX-V Komplex an Mac-1 und P-Selektin, was zur Rekrutierung von Leukozyten zu entzündlichen Prozessen beiträgt (Romo 1999)(Simon 2000)(Wagner 2003).

Die Blockierung der Bindungsstelle von GPIb-alpha für vWF durch einen inhibitorischen Antikörper verhindert das Tethering der Thrombozyten und die nachfolgende Thrombusbildung bei einem Modell der arteriellen Gefäßverletzung der Maus (Massberg 2003). Bei vWF knock out Mäusen, die ein Modell für die von Willebrand Krankheit

darstellen findet sich eine stark verlängerte Blutungszeit, Spontanblutungen sowie eine Beeinträchtigung der Thrombusbildung (Denis 1998).

2.2.2 Thrombozytenaktivierung - Glykoprotein VI

Die Aktivierung von Thrombozyten führt zur Verstärkung ihrer prokoagulatorischen Eigenschaften und ermöglicht die Aggregation und damit Thrombusbildung an der Lokalisation der Gefäßverletzung (Savage 2001). Die wichtigsten Induktoren sind Kollagen, vWF, Thrombin, ADP, TxA₂ und Adrenalin. Der finale Weg all dieser Agonisten ist die Aktivierung von GP IIb/IIIa, dem wichtigsten Rezeptor für die Thrombozytenaggregation (Kulkarni 2000). Phänotypisch kommt es zur Ausspreizung und Ausbildung von Pseudopodien sowie zur Ausschüttung intrazellulärer Granula, die die Aktivierung weiter verstärken, die Gerinnungskaskade in Gang setzen und zur Vasokonstriktion führen (George 2000). Durch die Oberflächenexposition von Phosphatidylserin kann dieses als Bindungsstelle für Enzyme und Cofaktoren der Koagulationskaskade dienen, was letztendlich die lokale Thrombinbildung verstärkt (Davi 2007)(Lentz 2003)(Ruggeri 2002). Der Schlüsselrezeptor für die Initiierung der Thrombozytenaktivierung bei arterieller Thrombose ist das Glykoprotein VI.

Das Glykoprotein VI wird ausschließlich auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert und ist der Superfamilie der Immunglobulin-Rezeptoren zuzurechnen (Berlanga 2000). Es ist ein Typ I Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 60-65 kDa, das mit der Fc-Rezeptor gamma-Kette einen Komplex bildet (Clemetson 1999)(Nieswandt 2000). Diese dient der Signaltransduktion durch die Tyrosinphosphorylierung der ITAM-Domäne durch Src-like Kinasen, was zur Aktivierung der Tyrosinkinase Syk führt und eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt (Bauer 2001)(Tsuji 1997)(Watson 2001). Bei Thrombozyten dient GPVI als Kollagenrezeptor, wobei die Glycin-Prolin-Hydroxyprolin Sequenz des Kollagen das spezifische Bindungsmotiv darstellt (Knight 1999). Fibrilläres Kollagen Typ I und III bilden die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix von Blutgefäßen und werden bei Gefäßverletzungen exponiert. GPVI bindet an dieses fibrilläre Kollagen und vermittelt die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung unter arteriellen Flussbedingungen (Baumgartner 1977)(Clemetson 2001).

In vivo spielt dieser Rezeptor eine wichtige Rolle in allen Phasen der Thrombusbildung, vom initialen Tethering, über langsame Translokation und stabile Adhäsion bis zur Aggregation der Thrombozyten (Massberg 2003). Seine Hauptfunktion ist die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten auf kollagenhaltigen Oberflächen wie dies bei arterieller

Gefäßverletzungen der Fall ist (Nieswandt 2003). Durch die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt die Umwandlung der Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) und $\alpha_2\beta_1$ von einem niedrig in einen hoch affinen Zustand (Nakamura 1999)(Nieswandt 2001a)(Nieswandt 2001b). Dies verstärkt die Thrombozyten-Kollagen Interaktion, was wiederum die Stimulation der aktivierenden Signalkaskade durch GPVI fördert (Atkinson 2003). Weiterhin kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und zur Freisetzung gespeicherter Mediatoren wie ADP durch die aktivierten Thrombozyten (Nieswandt 2003)(Watson 2005).

Die durch Kollagen ausgelöste Aggregation wird vor allem durch die Freisetzung sekundärer Mediatoren wie ADP und TxA_2 aus aktivierten Thrombozyten vermittelt (siehe Abb. 3). Dadurch werden zirkulierende Thrombozyten aktiviert und tragen zum Thrombuswachstum bei (Davi 2007)(Nieswandt 2001c). Bei GPVI-depletierten Mäusen kann in vivo gezeigt werden, dass bei arterieller Gefäßverletzung sowohl die Thrombozytenadhäsion als auch die nachfolgende Thrombusbildung stark beeinträchtigt sind. Dies unterstreicht die Schlüsselfunktion von GPVI für diese Prozesse (Massberg 2003).

2.2.3 Thrombozytenaggregation

Bei der Aggregation kommt es zur Vernetzung von Thrombozyten untereinander, also zur homotypischen Interaktion zwischen bereits adhären und zirkulierenden Thrombozyten. Dieser Prozess ist entscheidend für das Thrombuswachstum und die Relevanz der beteiligten Faktoren ist abhängig von den vorherrschenden Scheerbedingungen (Jackson 2007). Essentiell hierfür ist die Interaktion des wichtigsten Integrins der Thrombozyten $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) mit Fibrinogen, aber auch mit vWF (Ruggeri 1999).

2.2.3.1 Integrine der Thrombozyten

Integrine sind heterodimere Proteine die jeweils aus einer nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen. Auf Thrombozyten sind fünf α - und zwei verschiedene β -Untereinheiten zu finden, wobei die Einteilung nach der β_1 oder β_3 Untereinheit erfolgt (Hynes 2002). Die Bindung dieser Integrine ist abhängig vom spezifischen Arginin-Glycin-Aspartat Bindungsmotiv der Liganden (Xiong 2002). Die Ligandenbindung setzt die Aktivierung der Integrine voraus, wodurch diese in einen hoch affinen Zustand versetzt werden, was als inside-out Signaling bezeichnet wird. Andererseits führt die Interaktion mit Liganden zu intrazellulären Signalen, die mit anderen Signalen der Thrombozytenaktivierung synergistisch wirken und so etwa die Aktinpolymerisierung und -reorganisation regulieren, was als outside-in signaling bezeichnet wird (Shattil 1998).

Eine wichtige Funktion thrombozytärer Integrine stellt die Vermittlung einer stabilen Thrombozytenadhäsion dar. Dies wird ermöglicht durch Bindung unterschiedlicher Komponenten der extrazellulären Matrix wie Vitronectin durch $\alpha_v\beta_3$, Kollagen durch $\alpha_2\beta_1$, Fibronectin durch $\alpha_5\beta_1$ sowie Laminin durch $\alpha_6\beta_1$ (Shattil 2004).

2.2.3.2 Glykoprotein IIb/IIIa

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist über die Brückenbildung mit Fibrin vor allem für die Aggregation der Thrombozyten verantwortlich und mit einer Kopienzahl von etwa 80.000 das häufigste Integrin auf der Oberfläche der Thrombozyten (siehe Abb. 3). Nach Thrombozytenaktivierung werden zudem weitere $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrine von intrazytoplasmatischen Membranen an die Oberfläche rekrutiert (Shattil 1985)(Wagner 1996). Außerdem spielt dieses Integrin in vivo und in vitro eine wichtige Rolle bei der Adhäsion auf exponierter subendothelialer Matrix und dysfunktionalem intaktem Endothel (Massberg 2005)(Theilmeyer 2002). Zu den Liganden zählen Fibrinogen und Fibrin (Bennett 1979)(Hantgan 1988), vWF (Ruggeri 1982), Vitronectin (Thiagarajan 1988), Fibronectin (Ginsberg 1983) sowie Thrombospondin (Karczewski 1989).

In unstimulierten Thrombozyten befindet sich GPIIb/IIIa in einem niedrig affinen Zustand für seine Liganden. Die Aktivierung kann entweder durch lösliche Agonisten wie ADP, TxA₂ und Thrombin oder immobilisierte Agonisten wie vWF über den GPIb-IX-V Komplex sowie Kollagen durch GPVI erfolgen (Kasirer-Friede 2004) (Daniel 1998)(Hung 1992)(Nieswandt 2001b). Bei diesem Prozess der Affinitätsmodulation kommt der Interaktion von Talin mit dem zytoplasmatischen Anteil des Integrins eine entscheidende Rolle zu (Petrich 2007)(Wegener 2007). Das inside-out Signaling führt zur Demaskierung der Ligandenbindungsstelle, die nun mit hoher Affinität an ihren Liganden binden kann (Smith 1994). Dies führt zur Thrombozytenaggregation, indem sich Thrombozyten über Liganden-Brückenbindungen gegenseitig vernetzen, wobei der Interaktion von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit Fibrin die entscheidende Bedeutung zukommt (Ikeda 1991)(Savage 1998). Zudem können weitere zirkulierende Thrombozyten über die Immobilisierung potentieller Liganden, wie z.B. vWF, an der Thrombozytenoberfläche in den wachsenden Thrombus integriert werden (Shattil 2004).

Die Ligandenbindung hat auch eine Stimulation des outside-in signalings zur Folge, was zu fester Thrombozytenadhäsion, Ausspreizung auf extrazellulärer Matrix, Retraktion des Fibrinklots und Entstehung prokoagulatorischer Aktivität beiträgt (Fox 1990)(Ruggeri 1997a)(Schoenwaelder 1997)(Weiss 1991). Weiterhin wird vermehrt CD40-Ligand auf der

Thrombozytenoberfläche präsentiert und es kommt zur Aktin abhängigen Formveränderung (Fox 1990)(May 2002)(Shattil 1998). Letzterer Vorgang ist abhängig von der Liganden induzierten Oligomerisierung des Integrins, da nur multivalente Liganden diese Signalkaskade in Gang setzen können (Abrams 1994).

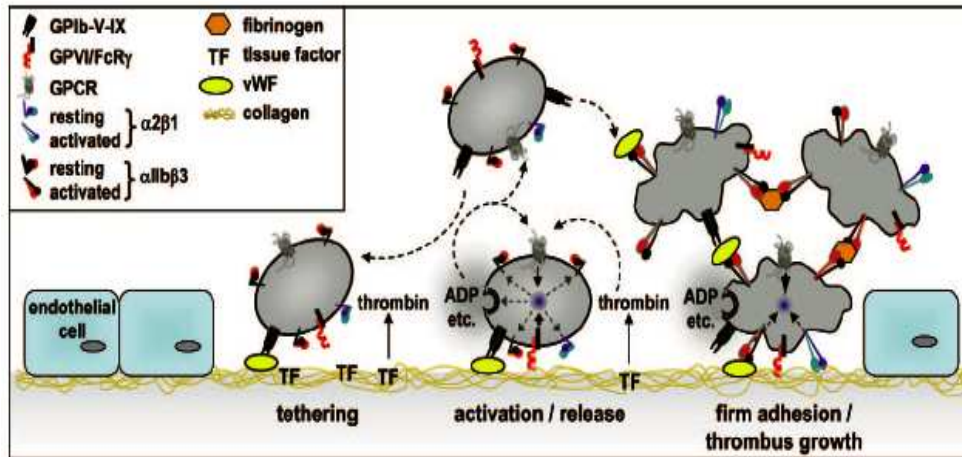


Abbildung 3: Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf subendothelialer Matrix

Die Interaktion des GPIb-V-IX Komplexes mit vWF ermöglicht das Tethering und die initiale Adhäsion der Thrombozyten. Dadurch wird die Interaktion von GPVI mit Kollagen ermöglicht, wodurch die Thrombozyten aktiviert werden. Dies führt zur Freisetzung von ADP und TxA_2 sowie zur Umwandlung der Integrine in einen hoch affinen Status für ihre Liganden. Das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) vermittelt die stabile Adhäsion sowie die Thrombozytenaggregation durch Brückenbildung mit Fibrinogen und vWF.

(aus Varga-Szabo et al. Cell adhesion mechanisms in platelets. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28 (2008) 403-412)

2.2.4 Mausmodelle

Bei der Untersuchung der Rolle von Thrombozyten im Prozess der Okklusion des Ductus arteriosus, werden drei Mausmodelle mit fehlenden oder dysfunktionalen Thrombozyten genutzt. Diese werden im folgenden Abschnitt näher dargestellt.

2.2.4.1 Mausmodell der Thrombozytopenie

Als Thrombozytopenie ist beim neonaten wie adulten Menschen eine Thrombozytenzahl von weniger als 150,000/ μ l Blut definiert. Ein vollständiges Fehlen der Thrombozyten durch einen genetischen Defekt ist beim Menschen noch nicht beschrieben worden. Obwohl beim Menschen sekundäre Thrombozytopenien weitaus häufiger sind als primäre, werden letztere doch mit zunehmender Häufigkeit diagnostiziert. Klinisch präsentieren sich kongenitale Thrombozytopenien meist als Schleimhautblutungen und Petechien oder Ecchymosen der Haut. Bekannte vererbliche Syndrome mit Thrombozytopenie sind das Alport-, Wiskott-Aldrich- und Bernard-Soulier-Syndrom (Drachman 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird das NF-E2 knock out Model von Shivdasani et al. verwendet, bei dem eine neo^R Kasette unmittelbar vor dem 5'-Ende der Sequenz der basischen Domäne im dritten Exon des p45 NF-E2 Gens inseriert wird. Das translatierte Produkt ist inaktiv, da es nicht mehr an die DNA binden und kein Heterodimer bilden kann (Shivdasani 1995b).

Der basische Leucin Zipper Transkriptionsfaktor NF-E2 ist sowohl an der Regulation der Thrombopoese als auch der Erythropoese beteiligt (Shivdasani 1995a)(Shivdasani 1996). Er ist ein Heterodimer, das aus einer vielfältig exprimierten p18 und einer p45 Untereinheit besteht, die nur in der erythroiden und megakaryozytären Zelllinie sowie in Mastzellen exprimiert wird (Andrews 1993). Die Thrombozytopenie wird durch eine Störung der terminalen Differenzierung von Megakaryozyten hervorgerufen. Dies unterbindet die Bildung von Pro-Thrombozyten, was auch die Abschnürung reifer Thrombozyten verhindert. Dadurch lassen sich bei NF-E2^{-/-} Mäusen keine Thrombozyten im peripheren Blut nachweisen (Lecine 1998). Auch die Proliferation von Vorläufern der Megakaryozyten ist beeinträchtigt. Im peripheren Blut finden sich Partikel in einer Menge von 4-8 x 10⁴/μl Blut, die Thrombozyten ähnlich sind, aber eine stark gestörte Organisation der Zellorganellen aufweisen. Zudem reagieren die Partikel nur sehr schwach auf Agonisten wie Thrombin und weisen damit neben morphologischen auch starke Funktionsdefizite auf (Levin 1999).

Phänotypisch zeigen die NF-E2^{-/-} Mäuse eine vollständige Thrombozytopenie, Splenomegalie mit Megakaryozytose sowie eine hypochrome mikrozytäre Anämie mit Retikulozytose. Alle anderen Organsysteme weisen keine pathologischen Veränderungen auf (Levin 1999). Die hypochrome, mikrozytäre Anämie wird durch eine Reifungsstörung der Erythrozyten erklärt, die eine Splenomegalie und kompensatorische Retikulozytose hervorruft. Hämolyse, Eisenmangel oder Blutungen können die Anämie der Tiere nicht erklären. Die Expression des Hämoglobin Gens, für das NF-E2 ein Enhancer ist, wird bei den knock out Mäusen nur leicht beeinträchtigt (Shivdasani 1995a).

2.2.4.2 Mausmodell der Glanzmann Thrombasthenie

Die Glanzmann Thrombasthenie wurde zum ersten Mal von Eduard Glanzmann als „hereditäre hämorrhagische Thrombasthenie“ beschrieben (Glanzmann 1918). Dabei handelt es sich um eine autosomal rezessive Erkrankung, die durch quantitative und/oder qualitative Veränderungen des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrins verursacht wird. Die α_{IIb} - und β_3 -Kette können hierbei beide oder auch jede für sich betroffen sein (Bellucci 2002). Die Unterscheidung der Subtypen erfolgt nach den Kriterien Aggregation und Thrombusretraktion. Bei Typ I kommt es zu keinerlei Thrombozytenaggregation und Thrombusretraktion, was auf eine fehlende

Expression des Integrins zurückzuführen ist. Typ II zeichnet sich durch eine fehlende Thrombozytenaggregation, aber residuelle Thrombusretraktion aus, da es hier noch zu einer geringgradigen Expression kommt. Daneben existieren noch einige Varianten (George 1990). Die Erkrankung wird beim Menschen typischerweise durch Schleimhautblutungen, Purpura und Menorrhagien symptomatisch, meist auch schon kurz nach der Geburt (Nurden 2005). Diagnostische Kriterien sind eine fehlende Thrombozytenaggregation, eine stark verlängerte Blutungszeit sowie eine abnormale Thrombusretraktion bei normaler Thrombozytenzahl und -morphologie (Nair 2002). Zusätzlich ist die Thrombozytenadhäsion beeinträchtigt (Nurden 2006).

Da der GP IIb/IIIa Rezeptor aus einer α_{IIb} - und einer β_3 -Kette besteht, kann sowohl durch knock out des einen wie auch des anderen Gens der Phänotyp der Glanzmann Thrombasthenie erzielt werden. Die β_3 -Kette bildet mit der α_V -Kette allerdings auch das $\alpha_V\beta_3$ Integrin (Vitronectinrezeptor) auf Thrombozyten, dessen bevorzugter Ligand nicht Fibrinogen, sondern Vitronectin ist (Kieffer 1991). Die β_3 -Kette ist auch bei der Bildung von anderen Integrinen auf einer Vielzahl von Zellen beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wird das Modell von Emambokus et al. verwendet, bei dem eine Deletion des Gens der α_{IIb} -Kette zum Phänotyp der Glanzmann Thrombasthenie führt. Hier wurde durch Einbringung der Sequenz des GFP-Cre Fusionsproteins in das erste Intron des gpIIb Locus eine gpIIb Nullallel erzeugt. Bei homozygoten $GPIIb^{GFP-Cre/GFP-Cre}$ Mäusen kann CD41 auf keinem Zelltyp mehr nachgewiesen werden, sodass auch auf Thrombozyten der GPIIb/IIIa-Komplex nicht mehr exprimiert wird (Emambokus 2003). Da die α_{IIb} -Kette ausschließlich mit der β_3 -Kette kombiniert, betrifft die Deletion spezifisch das thrombozytäre GP IIb/IIIa Integrin. In vivo kann nachgewiesen werden, dass bei dieser knock out Maus Thrombozytenaggregation und -adhäsion auf aktiviertem Endothel und exponierter subendothelialer Matrix stark beeinträchtigt sind (Massberg 2005).

2.2.4.3 Das anti-GPVI behandelte Mausmodell

Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Kollagen spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung von Hämostase und Thrombose in vivo. Für letzteren Prozess dient GPVI als zentraler Rezeptor (Nieswandt 2003). Bei Patienten, die im Rahmen von Autoimmunerkrankungen Antikörper gegen diesen Thrombozytenrezeptor bilden, ist eine milde Blutungsneigung sowie die fehlende Thrombozytenaggregation auf Stimulation durch Kollagen zu beobachten (Sugiyama 1987). Übereinstimmend kann bei der Maus gezeigt werden, dass ein GPVI-depletierender Antikörper bei Thrombozyten einen refraktären

Zustand gegenüber der Aktivierung durch Kollagen und eine verlängerte Blutungszeit induziert (Nieswandt 2001c). Ebenso führt ein Antikörper, der die wichtigste Kollagenbindungsstelle von GPVI blockiert, bei einem Modell für arterielle Thrombose der Maus *in vivo* zu einer starken Beeinträchtigung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Dies zeigt, dass GPVI essentiell für die arterielle Thrombusbildung ist (Massberg 2003).

In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls ein GPVI-blockierender Antikörper verwendet: um den thrombozytären Adhäsionsrezeptor GPVI zu blockieren, wird ein monoklonales rabbit anti-mouse GPVI ImmunglobulinG (IF 5-1-11) verwendet. Dieser Antikörper wird analog zu bereits beschriebenen Methoden hergestellt (Kremmer 1995). Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper werden Kaninchen mit einem adenoviral in HeLa-Zellen exprimierten murinen GPVI-Fc Fusionsprotein immunisiert. Zur Herstellung von Hybridomzellen wird die Myelom Zelllinie P3X63 Ag 8.653 mit Milzzellen aus dem immunisierten Kaninchen fusioniert. Der Überstand der Hybridomzellen wird auf Antikörper untersucht, die spezifisch mit dem GPVI-Fc Fusionsprotein reagieren. Die Ig-Klasse wird mit monoklonalen Antikörpern (anti-IgM, anti-IgG Subklasse) aus der Maus bestimmt. Um die monoklonalen Antikörper aufzureinigen, wird eine Protein G-Sepharose Säule verwendet. Die Spezifität des Antikörpers wird durch einen Western Blot gegen GPVI-Fc und Kontroll Fc-Protein verifiziert (Massberg 2004). Mit der Gabe dieses Antikörpers ist der wichtigste Rezeptor für Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten auf Kollagen blockiert (Nieswandt 2003).

2.2.5 Interaktion von Thrombozyten und Progenitorzellen

Thrombozyten sind nicht nur am thrombotischen Gefäßverschluss beteiligt, sondern spielen auch eine wichtige Rolle beim Gefäßremodelling. Denn die prompte Adhäsion von Thrombozyten im Bereich von Gefäßverletzungen führt zur Bildung eines thrombozytären Rasens, dessen Adhäsionsmoleküle die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten und Progenitorzellen unterstützt. Zudem sezernieren aktivierte und adhärente Thrombozyten eine Reihe von Chemokinen, die zusätzlich die Akkumulation dieser Zelltypen vermitteln. Für die Beteiligung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark an Reparatur und Remodelling von Gefäßläsionen finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise. Diese Zellen differenzieren sich dort in glatte Muskelzellen und Endothelzellen (Jiang 2004)(Sata 2002)(Sata 2003)(Shimizu 2001)(Simper 2002). Bei der Rekrutierung dieser Progenitorzellen werden Thrombozyten als wichtiger Faktor angesehen (Massberg 2006). Erst in den letzten Jahren wurden einige wichtige Mechanismen der Interaktion dieser beiden Zelltypen näher untersucht.

So kann *in vivo* gezeigt werden, dass nach Verletzung der Arteria carotis der Maus Progenitorzellen aus dem Knochenmark in Abhängigkeit von der Thrombozytenadhäsion innerhalb von 5-10 Minuten im Bereich der Gefäßläsion rekrutiert werden (siehe Abb. 4). Bei diesen Zellen handelt es sich um $CD34^+c-kit^+Sca-1^+Lin^-$ Zellen des Knochenmarks (Massberg 2006). Progenitorzellen können nicht direkt mit der extrazellulären Matrix interagieren, da ihnen entsprechende Adhäsionsrezeptoren fehlen. Jedoch verfügen sie über die Adhäsionsrezeptoren PSGL-1 und VLA-4 (Massberg 2006), deren Bindungspartner P-Selektin und VCAM-1 für das Homing in das Knochenmark essentiell sind (Frenette 1998)(Mazo 1998). Die direkte Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit Progenitorzellen wird durch P-Selektin/PSGL-1 vermittelt. P-Selektin ist auch an der Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten beteiligt (Diacovo 1996). Wird die Thrombozytenadhäsion im Bereich einer Gefäßläsion unterbunden, kommt es auch nicht zur Adhäsion von Progenitorzellen (Massberg 2006). Aber auch die Thrombozytenaggregation beeinflusst die Akkumulation von Progenitorzellen, da bei GPIIb knock out Mäusen signifikant weniger Progenitorzellen an der Gefäßläsion zu finden sind (Massberg 2006). Weiterhin scheinen weitere Thrombusbestandteile wie Fibrin für die Rekrutierung von Bedeutung zu sein (de Boer 2006).

Die Thrombozytenaktivierung führt zur Freisetzung des Chemokins SDF-1 α aus den alpha-Granula der Thrombozyten (Massberg 2006)(Jin 2006). Dieses Chemokin hat eine stabilen Anhaftung der Progenitorzellen an den Thrombus und an Endothelzellen zur Folge (Massberg 2006)(Peled 1999). Von SDF-1 α ist bekannt, dass es Progenitorzellen aus dem Blut zur vaskulären Intima rekrutiert (Schober 2003)(Zernecke 2005). Dabei kommt es zur Aktivierung der Integrine LFA-1 und VLA-4 auf humanen $CD34^+$ Zellen (Peled 2000). Die funktionelle Blockierung von SDF-1 α beeinträchtigt die Akkumulation von Progenitorzellen an Gefäßläsionen (Massberg 2006). Dies kann auch bei der Thrombozyten abhängigen Rekrutierung von Progenitorzellen an aktiviertes Endothel nach Ischämie/Reperfusion-Verletzung gezeigt werden (Stellos 2008).

Zudem modulieren Wachstumsfaktoren von Thrombozyten das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Progenitorzellen in der Neointima. Dabei spielen Faktoren wie PDGF-BB, VEGF, aber auch SDF-1 α eine Rolle (Hu 2004)(Ponomaryov 2000)(Simper 2002). *In vitro* führt die Kultivierung von Thrombozyten mit murinen embryonalen endothelialen T17b Progenitorzellen zu deren Differenzierung in reife Endothelzellen (Langer 2007). Weiterhin können hierdurch aus $CD34^+$ Progenitorzellen auch Makrophagen und Schaumzellen entstehen (Daub 2006). Die Differenzierung von $CD34^+$ Zellen in endotheliale

Progenitorzellen ist in vitro bei Kultivierung mit Thrombozyten zudem abhängig von thrombozytärem SDF-1 α (Stellos 2008). Außerdem beobachtet man eine PDGF abhängige Migration endothelialer Progenitorzellen in den Thrombus, was die Endothelialisierung des Thrombus ermöglicht (Langer 2006).

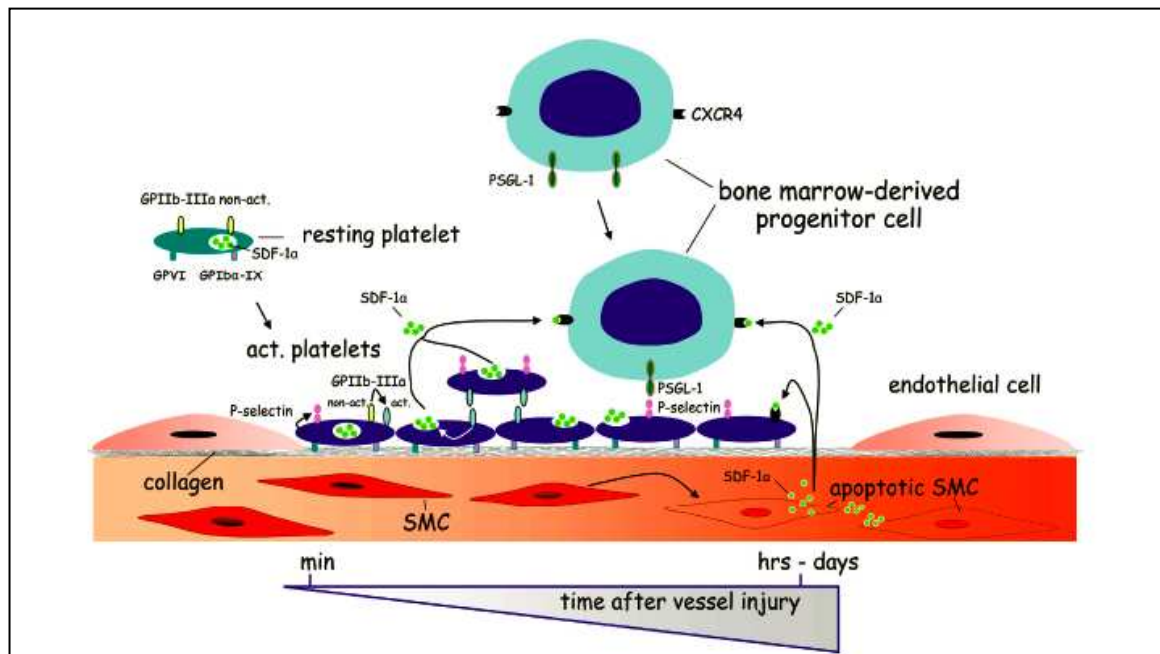


Abbildung 4: Adhärierende Thrombozyten rekrutieren Progenitorzellen aus dem Knochenmark zu Gefäßverletzungen

Innerhalb von Minuten kommt es durch die Exposition subendothelialer Matrix zur Thrombozytenadhäsion vermittelt durch den GPIb-V-IX Komplex und GPVI. Nach der Aktivierung von GPIIbIIIa sezernieren die Thrombozyten SDF-1 α und exprimieren P-Selektin auf ihrer Oberfläche. Dadurch wird die Rekrutierung von CXCR4⁺ Progenitorzellen über die PSGL-1-P-Selektin Interaktion innerhalb von Minuten nach Gefäßverletzung ermöglicht. Im weiteren Verlauf sezernieren apoptotische glatte Muskelzellen SDF-1 α . (aus Massberg, S. et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. J.Exp.Med. 203 (2006) 1221-1233)

2.3 Neointimaentstehung

Das intimale Remodelling im Rahmen des anatomischen Verschlusses des Ductus arteriosus wird von einigen Autoren als Neointimaformation bezeichnet und mit Mechanismen der pathologischen Neointimaformation verglichen (de Reeder 1988)(de Reeder 1990b)(Gittenberger-De Groot 1985)(Silver 1981)(Slomp 1992)(Tannenbaum 1996)(Yoder 1978). Im Folgenden werden die Abläufe der pathologischen Neointimaformation dargestellt, wobei insbesondere der Einfluss der Thrombozyten auf diesen Prozess erörtert wird.

2.3.1 Pathophysiologie und Histologie der Neointimaformation

Die Bildung einer Neointima ist als eine Reaktion der arteriellen Gefäßwand auf eine Vielzahl von schädigenden Einflüssen zu verstehen, die eine Veränderung der zellulären Zusammensetzung und der extrazellulären Matrix hervorrufen (siehe Abb. 5)(Newby 2000)(Schwartz 1995). Dieser Adaptationsmechanismus der Gefäßwand führt zu einer Intimahyperplasie und Intimaverdickung, also zu einer Zunahme sowohl der Zellzahl als auch der extrazellulären Matrix innerhalb der Intima, was eine Lumeneinengung der betroffenen Gefäße zur Folge hat (Newby 2000). Für Remodelling und Reparatur der Gefäßwandverletzung ist die Proliferation von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen von großer Bedeutung (Schwartz 1997). Die Prozesse in diesen Läsionen weisen Parallelen zu nicht voll ausheilenden Wunden auf (Farb 2004).

Dieser progrediente Umbau von Gefäßen ist bei einer Vielzahl pathologischer Gefäßveränderungen zu beobachten. Als Schlüsselfaktoren für die Neointimaformation werden endotheliale Denudation, mechanische Verletzung, chronische Entzündung oder Erhöhung des Wandstressses gesehen. So ist dieser Prozess etwa bei pulmonaler Hypertonie, venösen Koronar-Bypässen oder nach Ballonangioplastie und Stenting von Koronararterien zu beobachten (Dilley 1988)(Farb 1999)(Weiser 1995). Auch chronische Entzündungsreaktionen wie Atherosklerose und Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation können eine Neointimabildung hervorrufen (Ross 1999)(Salomon 1991).

Das am besten untersuchte Modell ist die Reaktion der Arteria carotis der Ratte auf eine Ballonangioplastie. Hierbei kommt es zunächst zu einer Zerstörung des Endothels, wodurch Thrombozyten adhärent werden und sich ein muraler Thrombus ausbildet (Clowes 1983b). Hierbei scheint die Freisetzung von PDGF von entscheidender Bedeutung für die Neointimaformation zu sein, denn PDGF fördert die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen der Media (Ferns 1991)(Ross 1990). Aktivierte Thrombozyten sezernieren weitere proinflammatorische Mediatoren wie TxA_2 und Serotonin, die eine ähnliche Wirkung wie PDGF ausweisen (Pakala 1997). Zudem kommt es zur Apoptose glatter Muskelzellen der Media (Clowes 1983b). Dies scheint ein adaptiver Remodellingprozess der Gefäßwand zu sein, um bei Abnahme des Blutflusses eine permanente Kontraktion gewährleisten zu können (Walsh 2000). Hierauf erfolgt innerhalb von vier Tagen die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media über die Lamina Elastica interna in die Intima (Clowes 1983b) (Lindner 1991). Voraussetzung dafür ist eine Modulation des Phänotyps von einem differenzierten kontraktilen zu einem weniger differenzierten synthetischen Typ glatter

Muskelzellen (Thyberg 1998). Die Migration wird durch Thrombozyten beeinflusst, da bei Thrombozytopenie die Neointimabildung stark beeinträchtigt wird (Fingerle 1989). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die Zellen der Neointima nicht nur aus der lokalen Gefäßwand stammen, sondern auch zirkulierende Progenitorzellen zur Läsion rekrutiert werden (Sata 2002), worauf im Folgenden näher eingegangen wird. Nachfolgend kommt es für Wochen bis Monate zur Proliferation der neointimalen Zellen, vor allem derer, die sich nahe am Lumen befinden (Clowes 1983a)(Clowes 1986). Dies wird durch ein gesteigertes Ansprechen auf Mitogene wie IGF-1, TGF-beta, bFGF und Angiotensin II erklärt (Cercek 1990)(Daemen 1991)(Lindner 1991)(Majesky 1991). Das Wachstum der Intima ist in der späteren Phase vor allem auf die Ablagerung extrazellulärer Matrix zurückzuführen. So kommt es zur vermehrten Synthese von Hyaluronan, Kollagen Typ I, Elastin und Fibronectin durch die glatten Muskelzellen der Intima (Thyberg 1997)(Wight 1995). Die vermehrte Expression von Matrix Metalloproteinasen treibt das Remodelling der extrazellulären Matrix weiter voran, welches die Migration glatter Muskelzellen begünstigt (Bendeck 1994).

Bei der Neointimaformation nach Stentimplantation beim Menschen laufen ähnliche Prozesse ab. Der Prozess der In-Stent Restenose führt zur Reduzierung des Gefäßdurchmessers und der Lumenweite. Dies ist unter anderem durch die vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF-beta gekennzeichnet, wodurch es zur Proliferation glatter Muskelzellen und Kollagenablagerung kommt (Ward 2000). Der murale Thrombus wird durch Makrophagen und alpha-actin negative spindelförmige Zellen invadiert, von denen nicht bekannt ist, ob sie dedifferenzierte glatte Muskelzellen aus der lokalen Media sind oder von zirkulierenden Progenitorzellen abstammen (Komatsu 1998). Makrophagen setzen Cytokine und Wachstumsfaktoren frei, welche die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen unterstützen (Ross 1993). Dies ist im Sinne einer Organisation des Thrombus mit Bildung von Granulationsgewebe zu sehen, wobei einwandernde glatte Muskelzellen eine Proteoglykan reiche Matrix synthetisieren (Carter 1994). Hierbei korreliert das Ausmaß der Intimahyperplasie positiv mit dem Grad der initialen Mediaschädigung sowie der Makrophageninfiltration (Farb 1999)(Virmani 1999).

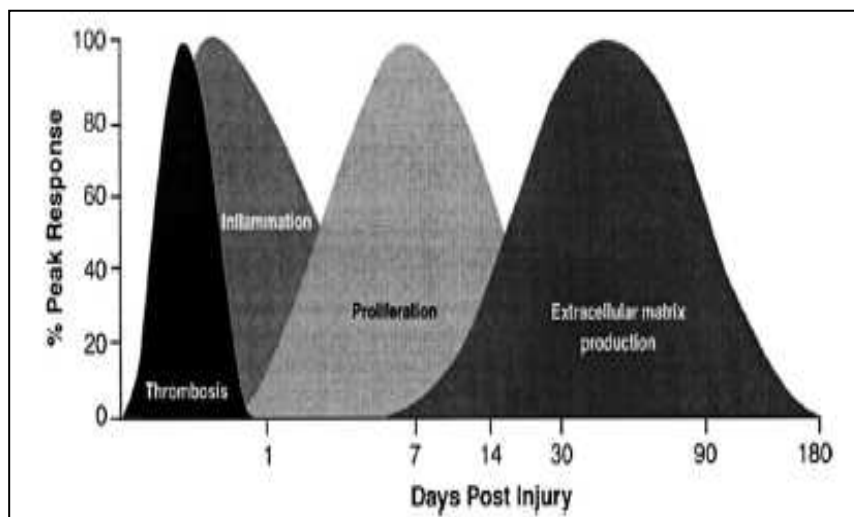


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Neointimaformation nach Angioplastie

Zunächst kommt es an der Gefäßverletzung innerhalb kürzester Zeit zur Thrombusbildung, gefolgt von der Einwanderung von Entzündungszellen. Innerhalb eines Tages wird die Proliferation der neointimalen Zellen induziert, im weiteren Verlauf wird vermehrt extrazelluläre Matrix produziert. Diese Prozesse führen zur Hyperplasie der Intima, was die Stenosierung des Lumens zur Folge hat.

(aus Weintraub, W. S. The pathophysiology and burden of restenosis. Am.J.Cardiol. 100 (2007) 3K-9K)

2.3.2 Rolle von Chemokinen bei der Neointimabildung

Die strukturellen Veränderungen der Gefäßwand im Rahmen der Neointimabildung werden durch eine Vielzahl von Botenstoffen beeinflusst (Schober 2007). Im folgenden wird auf die wichtigsten Chemokine näher eingegangen, die an der Koordination dieses komplexen Prozesses beteiligt sind.

Es kann gezeigt werden, dass Entzündungszellen, insbesondere Monozyten zur Progression des arteriellen Remodellings beitragen (Schober 2005). So kommt es nach Gefäßverletzung zur vermehrten Expression von MCP-1 (CCL2) in der Gefäßwand und zu erhöhten Plasmaspiegeln. Adhärente Thrombozyten immobilisieren MCP-1 an ihrer Oberfläche und ermöglichen so die Rekrutierung von Monozyten (Schober 2004). Die Produktion von MCP-1 in den glatten Muskelzellen der lokalen Gefäßwand wird verstärkt durch thrombozytäre Faktoren wie PDGF und Thrombin (Taubman 1992)(Wenzel 1995). Eine Blockierung von MCP-1 oder seines Rezeptors CCR2 reduziert die Neointimabildung einerseits durch die Inhibition der Makrophageninfiltration, andererseits durch die verminderte Proliferation glatter Muskelzellen (Schober 2004)(Furukawa 1999). Für die Fraktalkine/CXCR1-Achse konnte eine ähnliche Wirkung gezeigt werden (Lesnik 2003)(Liu 2006). Die Expression von Fraktalkine auf aktiviertem Endothel führt zur Stimulation der P-Selektin Präsentation auf adhärenen Thrombozyten, die hierdurch Leukozyten rekrutieren können (Schulz 2007). Ferner wird RANTES aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt und beeinflusst über die

Regulation der Monozytenadhäsion die Atherogenese und Neointimaformation (Huo 2003)(Schober 2002).

Da auch zirkulierende Progenitorzellen aus dem Knochenmark zur Neointimabildung beitragen (Sata 2002), wurden die Mechanismen ihrer Mobilisierung und Rekrutierung näher untersucht. SDF-1 α ist ein chemotaktischer Faktor für CD34⁺ Progenitorzellen und reife Blutzellen wie Lymphozyten und Monozyten (Aiuti 1997)(Bleul 1996). Nach einer Gefäßverletzung kommt es rasch zur Sekretion von SDF-1 α aus aktivierten Thrombozyten, die damit initial die Hauptquelle für SDF-1 α darstellen (Jin 2006)(Massberg 2006). Später wird SDF-1 α auch in glatten Muskelzellen der Media vermehrt exprimiert (Zhang 2006). In atherosklerotischen Plaques wird SDF-1 α von Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen stark exprimiert (Abi-Younes 2000). Eine wichtige Rolle kommt dabei HIF-1 zu, der in hypoxischem Gewebe eine erhöhte Expression aufweist und zur vermehrten SDF-1 α Bildung führt (Ceradini 2004). Die Transkription kann aber auch durch VEGF und IL-1 induziert werden (Grunewald 2006).

Durch SDF-1 α kommt es zur Mobilisierung von Progenitorzellen in das periphere Blut, wie dies für CXCR4⁺ (Ceradini 2004), c-kit⁻ lin⁻ Sca-1⁺ (Zernecke 2005), c-kit⁺ lin⁻ Sca-1⁺ (Shen 2001) Zellen gezeigt werden konnte. Wie unter 2.2.5 im Detail beschrieben, ist SDF-1 α an der Rekrutierung von Progenitorzellen zu Gefäßverletzungen beteiligt (Massberg 2006). Bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung kommt SDF-1 α eine zentrale Rolle durch die Rekrutierung zirkulierender hämatopoietischer Vorläuferzellen zu. Entsprechend verringert die Inhibition der SDF-1/CXCR4-Achse die Neointimabildung deutlich, insbesondere durch eine reduzierte Akkumulation glatter Muskelzellen (Schober 2003)(Zernecke 2005).

2.3.2 Rolle von Vorläuferzellen bei der Neointimabildung

Zentrales Charakteristikum einer Vielzahl stenosierender Gefäßerkrankungen ist eine überschießende intimale Akkumulation glatter Muskelzellen (Ross 1993)(Ross 1999). Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei diesen neointimalen Zellen ausschließlich um immigrierte glatte Muskelzellen aus der lokalen Media handelt (Schwartz 1998). Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass auch zirkulierende Progenitorzellen zur Neointimaformation beitragen.

So können Sata et al. zeigen, dass nach Induktion von Endotheldenudation und Mediaapoptose 63% der Zellen der Neointima aus dem Knochenmark stammen und an der Gefäßläsion zu alpha-SMA⁺ und CD31⁺ Zellen differenzieren. Bei atherosklerotischen Plaques in ApoE^{-/-} Mäusen weisen 42% der neointimalen alpha-SMA⁺ Zellen eine Herkunft

aus dem Knochenmark auf (Sata 2002). Das Ausmaß der Rekrutierung der Zellen aus dem Knochenmark ist dabei abhängig von der Schwere der Gefäßschädigung und dem Grad der Apoptose der Mediazellen (Tanaka 2003). Zudem kann die Hyperplasie inhibiert werden durch die Blockierung von Chemokinen wie MCP-1 (Furukawa 1999) und SDF-1 α (Zernecke 2005) sowie von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin (Hayashi 2000). All dies deutet darauf hin, dass es sich bei diesen eingewanderten Zellen nicht nur um lokale glatte Muskelzellen, sondern auch um zirkulierende Zellen handelt (Iwata 2007). Die Charakterisierung dieser zirkulierenden Vorläuferzellen ist allerdings uneinheitlich, da unterschiedliche Zellpopulationen zur Ausbildung dieses Zelltyps beitragen können. So kommt es sowohl bei Injektion unselektierter Knochenmarkszellen (Sahara 2005), als auch c-kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (Saiura 2001) und c-kit⁻ Sca-1⁺ PDGFR-beta⁺ Lin⁻ Zellen (Zernecke 2005) zur Rekrutierung der applizierten Zellen in den Bereich der Gefäßläsionen und anschließenden Differenzierung in alpha-SMA⁺ Zellen.

Weiter können Asahara et al. nachweisen, dass zirkulierende CD34⁺ Progenitorzellen in der Maus zu akuten Gefäßschädigungen rekrutiert werden und dort zur Neovaskularisierung und Reendothelialisierung beitragen (Asahara 1997). Die rekrutierten Zellen führen durch die Wiederherstellung der Endothelintegrität zur Reduzierung der Neointimabildung und damit auch der Lumeneinengung (Werner 2003). Weiterhin ist bekannt, dass dieser Vorläuferzelltyp nicht nur durch Inkorporation in neu entstehendes Endothel, sondern auch durch proangiogene Cytokine, welche die Migration und Proliferation von Endothelzellen stimulieren, zum Gefäßremodelling beiträgt (Gulati 2003)(Gunsilius 2000). Nach der Implantation einer Dacron-Gefäßprothese bei Hunden in der Aorta bildete sich das Endothel ausschließlich aus CD34⁺VEGFR2⁺ zirkulierenden Zellen, was direkte Evidenz für die Rolle endothelialer Progenitorzellen liefert (Shi 1998). Als Quelle für endotheliale Progenitorzellen kommen hämatopoietische Stammzellen, myeloide Zellen, zirkulierende undifferenzierte Progenitorzellen oder zirkulierende reife Endothelzellen in Frage (Urbich 2004). Als wichtigster Auslöser für die Mobilisierung und Rekrutierung dieser Vorläuferzellen wird die Gewebeischämie angesehen, wobei beim akuten Myokardinfarkt VEGF und SDF-1 α als wichtigste Botenstoffe fungieren (Lee 2000)(Pillarsetti 2001)(Yamaguchi 2003). Die Charakterisierung dieser Progenitorzellen ist ebenfalls uneinheitlich. Die Differenzierung zu Endothelzellen im Gefäßsystem konnte in vivo bei CD133⁺VEGFR2⁺ (Urbich 2004), CD34⁺VEGFR2⁺ (Shi 1998), CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ (Peichev 2000) sowie CD34⁻CD133⁺VEGFR2⁺ (Friedrich 2006) Zellen gezeigt werden. Allerdings ist unklar, ob diese

unterschiedlichen Marker nur verschiedene Differenzierungsstadien des gleichen Zelltyps darstellen(Urbich2004).

3 Problemstellung

Der Verschluss des Ductus arteriosus kurz nach der Geburt spielt in der postnatalen Kreislaufadaptation des Neugeborenen eine zentrale Rolle. Dieser physiologische Gefäßverschluss ist in seinen zellulären Vorgängen nach wie vor nicht vollständig verstanden und nur unzureichend untersucht. Da es im Zuge dieses Prozesses zur Ischämie der Gefäßwand mit nachfolgender Verminderung der PGE₂- und NO-Synthese (Kajino 2000), Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren sowie vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen kommt (Waleh 2005), ist auch mit einer Dysfunktionalität oder Kontinuitätsstörung des Endothels zu rechnen. Allerdings ist auch bekannt, dass Thrombozyten essentiell sind für den pathologischen Gefäßverschluss, bei dem ähnliche Veränderungen in Gefäßwand und Endothel zu beobachten sind. Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, genauer zu untersuchen, ob und gegebenenfalls wie Thrombozyten am Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt sind.

Das intimale Remodelling in der Phase des anatomischen Verschlusses wird von einer Vielzahl an Autoren als Neointimabildung bezeichnet (de Reeder 1988)(de Reeder 1990a)(Gittenberger-De Groot 1985)(Silver 1981)(Slomp 1992)(Tannenbaum 1996)(Yoder 1978). Die Entstehung einer Neointima kann bei vielen pathologischen arteriellen Gefäßveränderungen beobachtet werden und weist einige Ähnlichkeiten zu den postnatalen Vorgängen im Ductus arteriosus auf (Ward 2000). Anhand von Modellen des pathologischen Gefäßremodellings bei der Maus ist gezeigt worden, dass Thrombozyten auch an diesem Prozess beteiligt sind. Über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine induzieren sie die Rekrutierung zirkulierender Zellen sowie die Migration wandständiger glatter Muskelzellen (Gawaz 2008)(Massberg 2005)(Massberg 2006).

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Einblick in die zellulären Abläufe des postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus zu erlangen, wobei das Augenmerk besonders auf der Rolle der Thrombozyten bei der Obliteration des Lumens sowie beim intimalen Remodelling liegt:

1. Zunächst soll die Frage beantwortet werden, ob und in welcher Weise Thrombozyten am Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt sind. Dabei werden die für die Thrombusbildung verantwortlichen Faktoren mittels Methoden der Immunhistologie und Immunfluoreszenz untersucht.
2. Um die funktionelle Relevanz der Thrombozyten zu analysieren, wird der Verschluss des Ductus arteriosus angiographisch an Modellen mit beeinträchtigter Thrombozytenfunktion untersucht.

3. Da Thrombozyten beim pathologischen Gefäßremodelling eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und wie Thrombozyten an der Induktion des intimalen Remodellings und dem Proliferationsverhalten luminaler Zellen im Ductus arteriosus beteiligt sind. Hierzu wird die Zellzahl der Neointima von GPIIb^{-/-}, NF-E2^{-/-} und mit anti-GPVI Antikörper behandelten Mäusen mit der Zellzahl entsprechender Kontrolltiere histomorphologisch verglichen. Auch wird das Proliferationsverhalten intimaler Zellen des postnatalen Ductus arteriosus von Wildtyp und GPIIb^{-/-} Mäusen mittels Immunfluoreszenz verglichen.
4. Schließlich sollen die luminalen Zellen mithilfe der Identifikation verschiedener Oberflächenmarker näher charakterisiert werden. Hierzu wird der Ductus arteriosus zu verschiedenen Zeitpunkten postnatal entnommen und mittels Methoden der Immunhistologie und Immunfluoreszenz mikroskopisch untersucht. Um die RNA-Expression von Zellen innerhalb und außerhalb der Lamina elastica interna mittels PCR selektiv untersuchen zu können, soll die Laser-Mikrodissektion und konsekutive RNA-Analyse zum Einsatz kommen.

4 Material und Methoden

4.1 Vorbemerkung und Versuchsplan

Das Tierversuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998, letzte Fassung vom 28. Dezember 2006, genehmigt.

| Untersuchungsmethode | Ziele | Anzahl ausgewerteter Tiere/Altersgruppe | | | |
|---|--|---|------|-----------|------|
| | | pränatal | 1h | 12h | 24h |
| PCR | Feststellung des Genotyps | alle gezüchteten Tiere | | | |
| Hämatoxylin-Eosin-Färbung serieller Querschnitt des DA | Beurteilung von Morphologie, Zellzahl, Zeitverlauf | 3 | 3 | 3 | 3 |
| HE-Färbung bei wt, GPIIb k/o, NF-E2 k/o, NF-E2 wt, anti-GPVI und Isotyp | Zellzahl und Fläche innerhalb der Lamina elastica interna, Morphologie | | | wt=8 | |
| | | | | Isotyp=5 | |
| | | | | GPIIb=7 | |
| | | | | GPVI=5 | |
| | | | | NFE2=7 | |
| | | | | NFE2wt=6 | |
| Ki67 Immunfluoreszenz bei wt, GPIIb wt, GPIIb k/o | Proliferationsrate innerhalb der Lamina elastica interna | | | je 3 | |
| Immunhistologie CD41, vWF, Fibrin, Kollagen Typ I | Nachweis der Thrombusbildung im DA | Je 3 | je 3 | je 3 | je 3 |
| Immunfluoreszenz | Charakterisierung der Zellen Veränderungen im Zeitverlauf | Je 3 | je 3 | je 3 | je 3 |
| Laser-Mikrodissektion | Isolierung des Bereichs innerhalb der L.e.i. | | | 12 | |
| PCR der LPC-Proben | Charakterisierung der Zellen innerhalb/außerhalb der L.e.i. | | | je 2-6 | |
| Angiographie bei wt, Isotyp, GPIIb k/o, anti-GPVI NF-E2 k/o, NF-E2 wt und anti-SDF-1 α | Untersuchung der funktionellen Relevanz von Thrombozyten und SDF-1-alpha für den Verschluss des DA | | | wt=20 | |
| | | | | Isotyp=15 | |
| | | | | GPIIb=16 | |
| | | | | GPVI=13 | |
| | | | | NFE2=13 | |
| | | | | NFE2wt=7 | |
| | | | | SDF-1=10 | |
| Isotyp=15 | | | | | |

Tabelle 1: Versuchsplan

DA: Ductus arteriosus
 HE: Hämatoxylin-Eosin
 L.e.i.: Lamina elastica interna
 LPC: Laser Pressure Catapulting

PCR: Polymerase chain reaction
 SDF-1: Stromal cell derived factor 1
 vWF: von Willebrand Faktor
 wt: Wildtyp

4.2 Versuchstiere

Bei den untersuchten Tieren handelt es sich um neugeborene Mäuse. Diese Mäuse aus dem C57Bl6/J Stamm werden als Wildtypen oder nach Behandlung mit Antikörpern gegen GPVI oder SDF-1 α verwendet. Die knock out Mäuse für GPIIb und die korrespondierenden GPIIb^{+/+} Tiere haben ebenfalls einen C57Bl6/J-Hintergrund (Emambokus 2003). Die pränatal und eine Stunde postnatal gewonnen Proben werden Mäusen entnommen, die durch Sectio Caesarea entwickelt wurden, alle anderen Mäuse werden auf natürlichem Wege ohne weitere Behandlung geboren. Für die pränatalen Präparate werden die Mäuse am errechneten 18. Gestationstag durch Sectio Caesarea entwickelt; unmittelbar danach wird der Ductus arteriosus entnommen. Dies dient zur Beurteilung der Morphologie des Ductus arteriosus in utero vor der normalen Geburt.

Die Mäuse werden standardisiert in Makrolonkäfigen des Typs II gehalten, in denen maximal sechs Tieren auf Fasereinstreu (Altromin GmbH & Co KG, Lage-Lippe, Deutschland) gehalten werden. Das Wasser und das Futter (Altromin-Haltungsfutter Maus/ Ratte, Altromin GmbH & Co KG, Lage-Lippe, Deutschland) steht für die Tiere ad libitum zur Verfügung. Außerdem wird den Tieren sterilisierter Zellstoff und Kriechröhrchen aus Pappe zum Nestbau zur Verfügung gestellt. Die Umgebungstemperatur liegt bei konstanter Belüftung zwischen 20 bis 25 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60% bis 70%. Das Beleuchtungsregime besteht aus einem geregelten Hell-Dunkelrhythmus, wobei in der Hellphase 50 bis 100 Lux im Käfig erreicht werden. In regelmäßigen Abständen werden zur Überwachung des Gesundheitsstatus serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen nach FELASA Richtlinien durchgeführt.

Für die Behandlung mit anti-GPVI Antikörper und die entsprechende Isotyp-Kontrolle werden C57Bl6/J Mäuse gezielt verpaart, um den trächtigen Weibchen zwölf Stunden vor dem errechneten Geburtstermin nach 18,5 Tagen 200 μ g des jeweiligen Antikörpers intraperitoneal zu injizieren. Tritt die Geburt nicht innerhalb von zwölf Stunden nach Injektion ein, so wird den trächtigen Weibchen erneut 200 μ g des Antikörpers injiziert. Damit wird erreicht, dass zwischen Injektion und Geburt höchstens ein Abstand von zwölf Stunden besteht. Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um Immunglobulin G, das einen transplazentaren Transport gewährleistet. Für die Auswertung werden n=7 Mäuse berücksichtigt. Als Isotyp-Kontrolle dient ein IgG Antikörper (IgG-Isotyp LMP 2A-TP), der n=5 in die Auswertung einbezogenen Mäusen injiziert wurde. Seine Herstellung erfolgt analog zur oben beschriebenen Methode.

4.3 Entnahme des Ductus arteriosus

Aus den Versuchstieren wird der Ductus arteriosus zu vier verschiedenen Zeitpunkten entnommen:

1. pränatal am 18. Gestationstag
2. eine Stunde postnatal
3. zwölf Stunden postnatal
4. 24 Stunden postnatal

Für jede Untersuchung werden Proben von mindestens drei unterschiedlichen Tieren ausgewertet. Zur Narkotisierung der Mäuse wird Midazolam (50 mg/kg Körpergewicht, Ratiopharm, Ulm, Deutschland), Medetomidin (5 mg/kg Körpergewicht, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland), und Fentanyl (0.5 mg/kg Körpergewicht, CuraMed Pharma GmbH, München, Deutschland) intraperitoneal injiziert. Nach Erlöschen der Schmerzreflexe werden die Tiere mittels Durchtrennung des zervikalen Rückenmarks getötet. Nach medianem Halsschnitt, Sternotomie und Rippenteilresektion wird der DA und die Vena cava dargestellt. Mittels ventrikulärer Applikation von 2ml steriler 95% v/v Kochsalzlösung und Eröffnung der Vena cava wird das Tier vollständig entblutet. Hierauf erfolgt die Sternotomie zur Darstellung des Ductus arteriosus. Nach Abtrennung des Ansatzes an Aorta und Arteria pulmonalis wird der Ductus arteriosus entnommen.

4.4 Präparation des Ductus arteriosus

4.4.1 Anfertigung von Paraffinpräparaten

Für Histologie und Immunhistologie werden in Formalin fixierte Paraffinpräparate angefertigt. Hierzu wird der entnommene Ductus arteriosus für 3 Stunden in 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Anschließend erfolgt die Einbettung in ein 4% Agargel (Agar, usb corporation, Cleveland, USA) gelöst in destilliertem Wasser. Dies erleichtert die Ausrichtung des Gefäßes und schützt das Präparat auch in den folgenden Schritten der Paraffin-Einbettung. Dazu wird das Gel in die Löcher einer Zellkulturplatte (Falcon Zellkulturplatte, 12 Vertiefungen, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes NJ, USA) gegossen, und durch Abkühlen des Gels eine festere Konsistenz abgewartet. Der Ductus arteriosus wird nun in das noch zähe Gel gegeben und mit einer Pinzette senkrecht aufgestellt. Nachdem sich das Gel komplett durch weiteres Abkühlen verfestigt hat, wird der Gelblock mit einer Mikrotomklinge (Microtome Blade, Firma Feather, Osaka, Japan) in eine Scheibenform geschnitten, in der sich der aufgerichtete DA befindet (siehe Abb. 6); diese wird dann in eine Einbettkassette (Einbettkassette, Firma Medite, Burgdorf, Deutschland)

gelegt. Hierauf wird das Präparat entwässert, für 90 Minuten in 80% und 96% Alkohol, dann für zweimal 60 Minuten in 100% Alkohol. Abschließend wird es für zweimal 90 Minuten in Xylol belassen und für drei Stunden in 58°C warmes, flüssiges Paraffin gegeben.

Die Gelscheiben werden auf die Wärmeplatte des Einbettautomaten (Einbettautomat TBS 88, Firma Medite, Burgdorf, Deutschland) gelegt und dann mit einer Mikrotomklinge zu einem Quader zurechtgeschnitten, der dann in die Mitte eines EinbettSchälchens platziert (EinbettSchälchen, Firma Medite, Burgdorf, Deutschland) und mit 60°C warmem Paraffin übergossen wird. Von den gekühlten, in Paraffin eingebetteten Präparaten werden hierauf mittels Mikrotom (HM 335E, Firma Microm, Walldorf, Deutschland) 2µm dicke Schnitte angefertigt. Dabei wird jeweils der Übergang zur Aorta und Arteria Pulmonalis verworfen, und es werden nur die quer getroffenen Schnitte des Ductus arteriosus berücksichtigt. Die Schnitte werden zur weiteren Verwendung auf Objektträger (Superfrost Plus Objektträger, Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, Deutschland) gezogen.

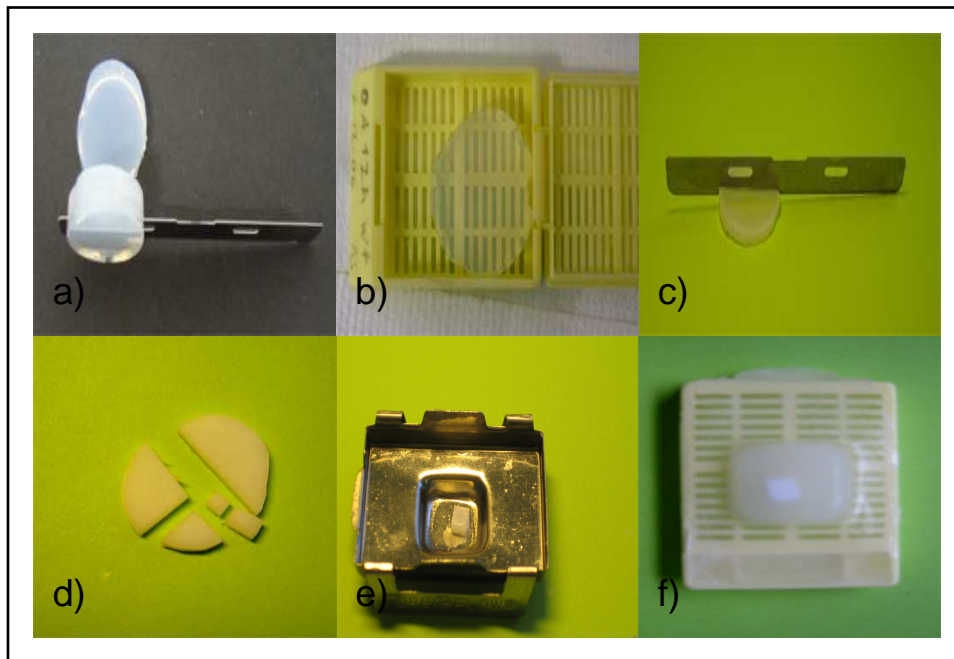


Abbildung 6: Anfertigung von Paraffinpräparaten des Ductus arteriosus

a) Nach der senkrechten Ausrichtung des DA in der Gelsäule wird diese in einzelne Scheiben zerteilt **b)** Die DA enthaltende Scheibe wird in eine Einbettkassette gegeben und entwässert sowie in flüssiges Paraffin gegeben **c)** Danach wird das Präparat auf eine Wärmeplatte gegeben und wieder zerteilt **d)** Dadurch wird der Teil des Gels der den DA enthält zu einem kleinen Quader geformt, **e)** der nun in ein EinbettSchälchen gegeben und mit Paraffin übergossen wird. **f)** Beim fertig eingebetteten Präparat ist der Quader mit dem senkrecht ausgerichteten DA deutlich zu erkennen.

4.4.2 Anfertigung von Gefrierpräparaten

Für die Laser-Mikrodissektion und die Immunfluoreszenz werden Gefrierschnitte angefertigt. Der Ductus arteriosus wird dazu in einer halbkreisförmigen Form längs ausgerichtet und in ein Gefriermedium (Tissue Tek OCT Compound, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet. Über Nacht wird das Präparat bei -80°C eingefroren. Im Cryotom (Cryotom CM 1850, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wird der gefrorene Block mit vorgekühltem Gefriermedium auf einem ebenfalls vorgekühlten Stempel ausgerichtet, wodurch ein Auftauen verhindert wird. Der Ductus arteriosus ist nun so orientiert, dass er senkrecht zur Oberfläche des Stempels gerichtet ist. Es werden $5\mu\text{m}$ dicke Querschnitte bei -25°C angefertigt, die für die Laser-Mikrodissektion auf einen mit Polyethylen beschichteten Objektträger gegeben werden (PALM Membrane Slides PEN-Membrane, 1mm glass, PALM Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland). Diese Objektträger sind mit RNAsen blockierenden Substanzen vorbehandelt. Dazu werden sie für 20 Sekunden in einen RNase Inhibitor gegeben (RNase Away, Molecular Bio Products, San Diego, USA), darauf in Di-Ethyl-Pyro-Carbonat (DEPC) behandeltem destillierten Wasser zweimal gewaschen. Hierauf werden sie bei 37°C für 2h in sterilen Zellkulturschalen (Gewegekulturschale steril Cellstar Greiner Bio-one GmbH Frickenhausen, Deutschland) getrocknet. Abschließend werden sie durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 245nm für 30 Minuten bestrahlt, um die Hydrophobie der Membranoberfläche zu reduzieren. Nach Aufbringen der Schnittpräparate auf die Objektträger werden diese in Falcon Tubes (50 ml polypropylen conical tube Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes New Jersey, USA) gegeben und auf Trockeneis gelagert, um die Kühlkette nicht zu unterbrechen. Für die Immunfluoreszenz werden normale unbehandelte Objektträger (Superfrost Plus Objektträger, Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, Deutschland) verwendet.

4.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung des Ductus arteriosus

Für die Histologie werden Paraffinpräparate wie oben angegeben hergestellt. Zusätzlich wird der Ductus arteriosus zur Darstellung des funktionellen Verschlusses zwei und drei Stunden postnatal bei jeweils drei Tieren entnommen. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung der Präparate wird am Färbeautomat (Tissue Strainer TST 30, Medite Medizintechnik, Burgdorf) durchgeführt. Zu jedem der unter 4.3 angegebenen Zeitpunkte werden pro Gruppe jeweils mindestens drei Präparate von mindestens drei unterschiedlichen Tieren betrachtet, um den morphologischen Ablauf des Verschlusses Ductus arteriosus verfolgen und mit der pränatalen

Morphologie vergleichen zu können. Die Präparate werden digital bei 40-facher Vergrößerung am Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) mit einer Kamera fotografiert (AxioCam, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland).

4.6 Immunhistologie

Die Schnitte des Ductus arteriosus werden, wie unter 4.4.1 beschrieben, angefertigt. Es werden pro Antikörper jeweils drei Präparate von drei verschiedenen C57Bl6/J Mäusen ausgewertet, die eine Stunde, 12 und 24 Stunden nach der Geburt geopfert wurden. Das Kontrollgewebe wurde entweder neonaten oder adulten C57Bl6/J Mäusen entnommen.

Die angefertigten Paraffinschnitte werden, soweit nicht anders angegeben, wie folgt behandelt: zunächst werden die Präparate in Xylol gegeben, um das Paraffin zu entfernen. Anschließend werden sie in einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser rehydriert. Zur Antigendemaskierung werden die Schnitte in Citratpuffer bei pH=6 in einem Dampfkochtopf für sieben Minuten gekocht. Alle nachfolgenden Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Verdünnung der Normalseren, Antikörper, und Enzymkomplexe erfolgt durch ein Verdünnungsmedium (Antibody Diluent, DAKO, Glostrup, Dänemark). Zwischen den einzelnen Schritten werden die Präparate mit Tris-Puffer gewaschen. Das Blocken der endogenen Peroxidase Aktivität des Gewebes wird durch 10-minütige Inkubation in 3%igem Wasserstoffperoxid in Aqua destillata erreicht. Endogenes Biotin wird durch 15-minütige Inkubation mit Avidin- und Biotin-Lösung (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) geblockt. Danach erfolgt die Färbung nach der ABC- oder LSAB-Methode, die im Weiteren näher beschrieben werden. Abschließend wird das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung durch die einminütige enzymatische Umsetzung der DAB-Lösung (Liquid DAB Substrate Chromogen System, DAKO, Glostrup, Dänemark) visualisiert, wobei 15 µl DAB auf 750 µl HRP-Puffer verwendet werden.

Daraufhin erfolgt die Kernfärbung der Präparate mit Hämalaun-Lösung für 30 Sekunden. Die Präparate werden nun in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, in Xylol gegeben und mit einem Deckglas versehen. Die Präparate werden digital am Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) mit einer Kamera fotografiert (AxioCam, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland).

4.6.1 Die ABC-Methode

Die Avidin-Biotin-Complex Methode dient der Verstärkung der spezifischen Färbung unter Ausnutzung die Interaktion von Avidin mit Biotin. Hierfür werden je nach Spezies unterschiedliche ABC-Kits (Vectastain Elite ABC Standard Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet, welche jeweils aus einem biotinyliertem Sekundärantikörper und einem Normalserum bestehen, welches wiederum aus der Spezies stammt, in der der Sekundärantikörper generiert wurde.

| Sekundärantikörper gegen | Normalserum aus |
|--------------------------|-----------------|
| Ziege | Kaninchen |
| Kaninchen | Ziege |

Ferner ist ein Enzymkomplex enthalten, bei dem durch Inkubation Avidin mit biotinylierter HRP zu einem Komplex fusioniert, der die lokale Umsetzung von DAB in einen braunen Farbstoff ermöglicht. Für die Färbung werden die Präparate zunächst für 30 min mit dem Normalserum in einer 1,5% Verdünnung inkubiert. Danach erfolgt für eine Stunde die Bindung des Primärantikörpers, dann für 30 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (5µl Sekundärantikörper, 15µl Normalserum auf 1ml). Abschließend folgt die Inkubation mit dem Enzymkomplex, bei dem das Avidin des Avidin-Biotin-HRP-Komplexes an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet.

4.6.1.1 CD41

Als Kontrollgewebe dient neonater Darm. Zur Detektion wird das ABC-Kit gegen Primärantikörper aus der Ziege verwendet. Zunächst werden die Schnitte für 30 Minuten in Citratpuffer von pH=6 durch einen vorgeheizten Dampfgarer behandelt. Die Schnitte werden nun für eine Stunde mit dem Primärantikörper (polyconal goat anti-Integrin alpha IIb antibody sc-6602, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) in einer Verdünnung von 4µg/ml in Antibody Diluent inkubiert.

4.6.1.2 von Willebrand Faktor

Als Kontrollgewebe wird adultes Gehirn genutzt. Zur Detektion wird das ABC-Kit gegen Primärantikörper aus dem Kaninchen verwendet. Der Primärantikörper wird für eine Stunde (rabbit anti-human vWF polyclonal antibody ab7356, Chemicon, Billerica, MA, USA) in einem Verhältnis von 5µg/ml mit Antibody Diluent aufgetragen.

4.6.1.3 Fibrin/Fibrinogen

Als Kontrollgewebe dient eine adulte thrombosierte A. carotis. Zur Detektion wird das ABC-Kit gegen Primärantikörper aus dem Kaninchen verwendet. Die Präparate werden mit dem Primärantikörper (rabbit anti-human fibrinogen polyclonal antibody A0080, Dako, Glostrup, Dänemark) beziehungsweise der Isotypkontrolle (rabbit Ig fraction solid phase absorbed, Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 11,5µg/ml mit Antibody Diluent für eine Stunde inkubiert.

4.6.1.4 Flk-1

Das Endothel der Nabelvene der neugeborenen Maus wird als Kontrollgewebe genutzt. Zur Detektion wird das ABC-Kit gegen Primärantikörper aus dem Kaninchen verwendet. Dem Waschpuffer werden 0,1% Tween zugesetzt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Die Präparate werden mit dem Primärantikörper (rabbit polyclonal anti-mouse VEGF Receptor 2 Antibody ab2349, abcam, Cambridge, Großbritannien) in einer Verdünnung von 20µg/ml mit Antibody Diluent für eine Stunde inkubiert.

4.6.2 Die LSAB-Methode – CD45

Die Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode beruht im Wesentlichen auf denselben Prinzipien wie die ABC-Methode. So kommt ein biotinylierter Sekundärantikörper zum Einsatz, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist. An das Biotin des Sekundärantikörpers bindet das Streptavidin-Biotin-Enzymkonjugat, das die Umsetzung von DAB in braunen Farbstoff ermöglicht.

Für die CD45 Färbung dienen Schnitte von Milzgewebe als Kontrollgewebe. Die Präparate werden mit dem Primärantikörper (monoclonal rat IgG2S anti-mouse CD45 antibody 30-F11, eBioscience, San Diego USA) in einer Verdünnung von 5µg/ml mit Antibody Diluent für eine Stunde inkubiert. Anschließend werden die Präparate für 30 Minuten mit dem sekundären Antikörper (biotinylated polyclonal rabbit anti-rat immunoglobulins, DAKO, Glostrup, Dänemark) in einem Verhältnis von 1:50 mit Antibody Diluent inkubiert. Im nachfolgenden Schritt wird der Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Streptavidin peroxidase aus Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse, DAKO, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten auf den Schnitten belassen.

4.7 Immunfluoreszenz

Wie unter 4.4.2 beschrieben, werden die Gefrierschnitte des Ductus arteriosus angefertigt. Es werden jeweils drei Gefrierpräparate des Ductus arteriosus von drei verschiedenen C57Bl6/J Mäusen verwendet, die eine, 12 und 24 Stunden nach der Geburt geopfert werden. Das Kontrollgewebe wird entweder neonaten oder adulten C57Bl6/J Mäusen entnommen. Soweit nicht anders angegeben wird die Immunfluoreszenz-Methode wie im Folgenden beschrieben durchgeführt:

Die Präparate werden für 3 Minuten in 4% Formalin in Aqua destillata fixiert und daraufhin zur Rehydrierung für 20 Minuten im Waschpuffer belassen (TBS+0,1% Tween; Tween 20, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die einzelnen Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Unspezifische Bindung wird mit Blockierung des Fc-Rezeptors erreicht, wozu ein anti-mouse CD16/32 Antikörper (affinity purified rat anti mouse CD16/32, Clone 93, eBioscience, San Diego, USA) in einer Verdünnung von 1:200 für 30 Minuten auf die Präparate gegeben wird. Alternativ wird 3% BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in TBS für 30 Minuten zum Blocken verwendet, gegebenenfalls auch eine Kombination von beidem. Anschließend erfolgt für jeweils eine Stunde die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper. Für die Isotypkontrolle wird ein identischer Antikörpertyp eingesetzt, der gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet ist. Als Sekundärantikörper werden grün (Alexa 488) oder rot (Alexa 596) fluoreszierende Antikörper der Firma Invitrogen (Invitrogen Inc., Eugene, Oregon, USA) aus unterschiedlichen Spezies verwendet. Zur Darstellung der Zellkerne wird DAPI 1:3000 (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, SIGMA, USA) für sechs Sekunden auf die Präparate gegeben. DAPI weist mit einem Emissionsmaximum von 488nm eine blaue Fluoreszenz auf. Abschließend werden die Objektträger mittels eines Klebers (Mounting Medium, DAKO, Glostrup, Dänemark) mit Deckgläschen versehen. Die Präparate werden digital am Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) mit einer Kamera fotografiert (AxioCam, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland).

4.7.1 Ki67, c-kit, CD34, Sca-1 und CD133

Als Kontrollgewebe dienen:

1. Für Ki67 und c-kit adulter Darm, wobei Ki67 das proliferierende basale Darmepithel und c-kit den Plexus submucosus/myentericus anfärbt
2. Für CD34 und CD 133 adulte Niere, bei der es zu einer Anfärbung der Kapillaren in der Glomeruli bzw. des Tubulusepithels kommt
3. Für Sca-1 neonates Gehirn, wobei das Endothel angefärbt wird

Die unspezifische Bindung des Fc-Anteils der Antikörper wird durch Blockade von Fc-Rezeptoren verhindert. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primäantikörper:

1. Ki67: PE tagged mouse anti-human Ki67 IgG (556027, BD Biosciences, San Jose, USA) 20µg/ml in TBS über Nacht bei 4°C
2. c-kit: monoclonal rat anti-mouse c-kit IgG_{2a} (MAB1356 R&D Systems, Minneapolis, USA) 5µg/ml in TBS
3. CD34: FITC conjugated rat anti-mouse CD34 IgG_{2a} (RAM34, BD Biosciences, San Jose, USA) 10µg/ml in TBS
4. Sca-1: FITC conjugated rat anti-mouse Sca-1 IgG_{2a} (E13-161.7, BD Biosciences, San Jose, USA) 20µg/ml in TBS
5. CD 133: PE-conjugated rat anti-mouse Prominin IgG₁ (13A4, eBiosciences, San Diego, USA) 10µg/ml in TBS

Anschließend wird der Sekundäantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben:

1. Für Ki67 ein goat rhodamine conjugated affinity purified anti-R-Phycoerythrin Antikörper 20µg/ml (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, USA).
2. Für c-kit ein donkey anti-rat Antikörper 5µg/ml (Alexa 596 donkey anti-rat antibody, Invitrogen , Eugene, USA)
3. Für CD34 ein goat anti-rat Antikörper 5µg/ml (Alexa 488 goat anti-rat antibody, Invitrogen , Eugene, USA)
4. Für Sca-1 ein goat anti-rat Antikörper 10µg/ml (Alexa 488 goat anti-rat antibody, Invitrogen , Eugene, USA)
5. Für CD133 ein donkey anti-rat Antikörper 5µg/ml (Alexa 596 donkey anti-rat antibody, Invitrogen , Eugene, USA)

4.7.2 SDF-1 α

Als Waschpuffer wird PBS mit 0,1% Tween verwendet, zur Verdünnung der Antikörper-Lösung wird PBS eingesetzt. Als Kontrollgewebe werden SDF-1 α positive Megakaryozyten im Knochenmark genutzt. Zur Fixierung dient 2% Formalin für 25 Minuten, gefolgt von Waschen in 2% Glycin-Lösung. Die Zellen werden mit 2% Triton X-100 (t-octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma Chemicals, St. Louis, USA) in PBS für 30 Minuten permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindung werden die Präparate jeweils für 30 Minuten mit einem Fc-Rezeptor Blocker und 3% BSA inkubiert. Dann wird der Primärantikörper (goat anti-human SDF-1 α IgG, AF-310-NA, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) in einer Konzentration von 5 μ g/ml für eine Stunde auf die Schnitte gegeben. Der Sekundärantikörper wird bei gleicher Konzentration ebenfalls eine Stunde auf den Schnitten belassen (Alexa 594 donkey anti-goat antibody, Invitrogen, Eugene, USA).

4.7.3 CXCR4

Zur Kontrolle dient die neonate Tonsille, bei der die Zellen des Kryptengrundes CXCR4 exprimieren. Als Waschpuffer wird PBS mit 0,1% Tween verwendet, zur Verdünnung wird PBS eingesetzt. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wird der Fc-Blocker 1:100 und BSA 3% für 30 Minuten auf den Schnitten belassen. Hierauf erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (PE-conjugated rat anti-mouse CXCR4 IgG2b 2B11, eBioscience, San Diego USA) in einer Konzentration von 10 μ g/ml. Zur Verstärkung der Färbung wird ein Sekundär- (rhodamine-conjugated affinity-purified goat anti-R-Phycoerythrin antibody, Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, USA) und Tertiärantikörper (Alexa 596 rabbit anti-goat antibody, Invitrogen, Eugene, USA) jeweils in einer Verdünnung von 1:100 für eine Stunde auf den Objektträgern belassen.

4.7.4 Kollagen Typ I

Als Kontrollgewebe dienen Cryoschnitte der Leber. Die Präparate werden für 3 Minuten in 4% Formalin fixiert, dann mit 2% Glycin-Lösung gewaschen. Zum Blocken wird 3% BSA für 30 Minuten verwendet. Der Primärantikörper (rabbit polyclonal anti-collagen I ab34407, abcam, Cambridge, Großbritannien) wird in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt, danach wird der Sekundärantikörper (Alexa 488 goat anti-rabbit antibody, Invitrogen, Eugene, USA) auf die Schnitte gegeben.

4.7.5 ABCG-2 und SM-Aktin

Als Kontrollgewebe dienen:

1. Für ABCG-2 adulter Darm, bei dem das Epithel apikal angefärbt wird
2. Für SM-Aktin adulter Darm, wobei die glatte Muskulatur der Darmwand zur Anfärbung kommt

Zur Permeabilisierung wird 2% Triton X-100 in TBS für 30 Minuten verwendet. Hierauf werden die Präparate für 30 Minuten mit 3% BSA inkubiert.

Als Primärantikörper werden eingesetzt:

1. ABCG-2: polyclonal rabbit anti-mouse ABCG-2 IgG PC-138 (Kamiya Biomedical, Seattle, USA) 9µg/ml in TBS
2. SM-Aktin: monoclonal mouse anti-human SM-Aktin IgG HHF 35 (DAKO, Glostrup, Dänemark) 0,5µg/ml in TBS

Als Sekundärantikörper werden folgende verwendet

1. Für ABCG-2 (Alexa 596 donkey anti-rabbit, Invitrogen, Eugene, USA) 5µg/ml in TBS
2. Für SM-Aktin (Alexa 488 goat anti-mouse, Invitrogen, Eugene, USA) 5µg/ml in TBS

4.7.6 VE-Cadherin, CD31 und CD41

Für VE-Cadherin und CD31 dient das Endothel der Aorta als Kontrollgewebe, für CD41 arterieller Thrombus. Nach Vorbehandlung mit 3% BSA erfolgt die Inkubation mit folgenden Primärantikörpern:

1. VE-Cadherin: rat anti-mouse VE-Cadherin IgG2a antibody 11D4.1 (BD Biosciences, San Jose, USA) 13µg/ml in TBS
2. CD31 (FITC-conjugated rat anti-mouse CD31 IgG2a antibody MEC13.3, BD Biosciences, San Jose, USA) 5µg/ml in TBS
3. CD41 (purified rat anti-mouse CD41 IgG1 antibody MWReg30, BD Biosciences, San Jose, USA) 5µg/ml in TBS

Als Sekundärantikörper wird für alle drei Primärantikörper ein donkey anti-rat Antikörper (Alexa 596 donkey anti-rat antibody, Invitrogen, Eugene, USA) in einer Konzentration von 5µg/ml eingesetzt.

4.7.7 Doppelfärbung CD34-Ki67

Als Kontrollgewebe dienen Niere und Darm. Eine Vorbehandlung mit Fc-Blocker wird durchgeführt. Die Färbungen werden wie oben für die jeweiligen Antikörper angegeben nacheinander durchgeführt, zunächst für CD34, danach für Ki67.

4.7.8 Doppelfärbung CD34-c-kit

Als Kontrollgewebe werden Niere und Darm verwendet. Zunächst werden die Fc-Rezeptoren mithilfe von Fc-Blocker abgesättigt. Die Färbungen werden wie oben für die jeweiligen Antikörper angegeben nacheinander durchgeführt, zunächst für c-kit, danach für CD34. Als Sekundärantikörper wird für CD34 eine anti-FITC Antikörper (Alexa 488 goat anti-FITC IgG fraction, Invitrogen, Eugene, USA) verwendet.

4.7.9 Doppelfärbung CD34-ABCG-2

Als Kontrollgewebe werden Niere und Darm verwendet. Zur Permeabilisierung wird 2% Triton X-100 für 30 Minuten auf den Schnitten belassen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wird zunächst der Fc-Blocker, dann 3% BSA eingesetzt. Die Färbung erfolgt synchron mit den oben angegebenen Primär- und Sekundärantikörpern.

4.7.10 Doppelfärbung CD34-VE-Cadherin und CD31-VE-Cadherin

Als Kontrollgewebe werden Niere und Aorta verwendet. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wird zunächst der Fc-Blocker, dann 3% BSA eingesetzt. Die Färbungen werden wie oben für die jeweiligen Antikörper angegeben nacheinander durchgeführt, zunächst für VE-Cadherin, danach für CD34 bzw. CD31. Als Sekundärantikörper wird für CD34 und CD31 eine anti-FITC Antikörper (Alexa 488 goat anti-FITC IgG fraction, Invitrogen, Eugene, USA) verwendet.

4.7.11 Doppelfärbung CD41-SDF-1 α

Als Waschpuffer wird PBS mit 0,1% Tween verwendet, zur Verdünnung der Antikörper wird PBS eingesetzt. Als Kontrollgewebe wird Knochenmark eingesetzt. Zur Fixierung dient 2% Formalin für 25 Minuten, gefolgt von Waschen in 2% Glycin-Lösung. Die Zellen werden mit 2% Triton X-100 in PBS für 30 Minuten permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindung werden die Präparate jeweils für 30 Minuten mit einem Fc-Rezeptor Blocker und 3% BSA inkubiert. Dann werden beide Primär- und Sekundärantikörper gleichzeitig wie oben angegeben für eine Stunde auf die Schnitte gegeben. Für SDF-1 α dient als

Sekundärantikörper ein rabbit anti-goat Antikörper (Alexa 488 rabbit anti-goat antibody, Invitrogen, Eugene, USA)

4.8 Zellzahl der Intima und Proliferationsverhalten

Um zu evaluieren, inwiefern die lokale Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten die Akkumulation intimaler Zellen beeinflusst, werden Paraffinpräparate des Ductus arteriosus verwendet. Hierfür werden folgende Gruppen einbezogen: GPIIb^{+/+} bzw. GPIIb^{-/-} C57Bl6/J, anti-GPVI bzw. Isotyp IgG Antikörper behandelt sowie NF-E2^{+/+} und NF-E2^{-/-}. Dazu wird der Ductus arteriosus zwölf Stunden nach der Geburt entnommen und wie oben beschrieben weiter behandelt. Es werden 2µm dicke Schnitte des Ductus arteriosus aus drei Bereichen im Abstand von jeweils 100µm angefertigt. Dabei werden nur Bereiche berücksichtigt, in denen quere Schnitte erzielt werden, die den gesamten Durchmesser des Gefäßes erkennen lassen. Die Übergangsbereiche zu Aorta und Arteria Pulmonalis werden verworfen. Somit handelt es sich um Schnitte aus:

1. dem der Arteria Pulmonalis nahen Bereich
2. der Mitte
3. dem aortalen Ende des Ductus arteriosus.

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung der Präparate für die morphometrische Auswertung wird am Färbeautomat (Tissue Strainer TST 30, Medite Medizintechnik, Burgdorf) durchgeführt. Die Präparate werden digital bei 40-facher Vergrößerung am Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) fotografiert (AxioCam, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland).

Für die Auswertung werden folgende Parameter von je zwei Schnitten aus jedem der drei Bereiche erhoben (siehe Abb. 7):

1. Die Fläche innerhalb der Lamina elastica interna
2. Die Anzahl der Zellkerne innerhalb der Lamina elastica interna

Die Anzahl der Zellkerne wird aus den Bildern der Hämatoxylin-Eosin Färbung ermittelt und in Relation zur Fläche innerhalb der Lamina elastica interna gesetzt, die mit Hilfe eines Auswertungssystems (Cap-Image, Version 7.4, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) quantifiziert wird. Für die statistische Auswertung wird jeweils der Mittelwert der Zellen pro Fläche der einzelnen Tiere herangezogen.

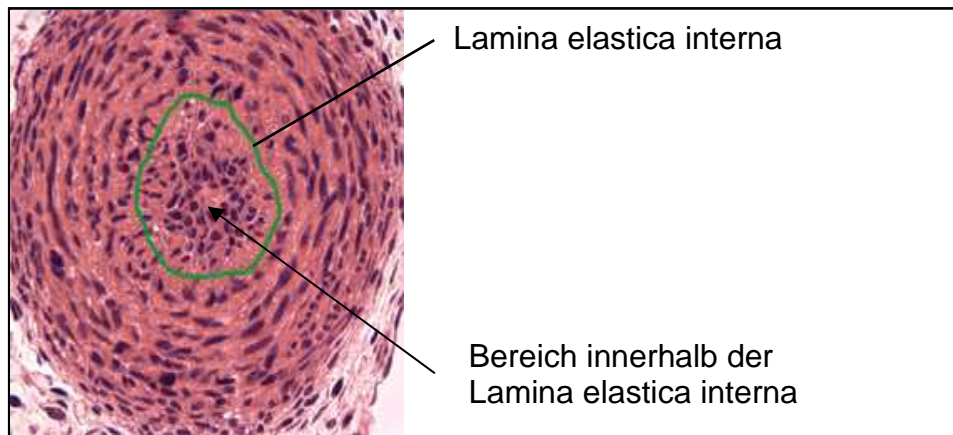


Abbildung 7: Darstellung der histomorphometrischen Ausmessung des DA

Die Lamina elastica interna ist grün markiert. Für die Auswertung wird die Fläche innerhalb der Lamina elastica interna ermittelt und zur Anzahl der Zellkerne innerhalb der Lamina elastica interna in Relation gesetzt.

4.8.1 Untersuchung des intimalen Proliferationsverhaltens

Hierfür wird die C57Bl6/J GPIIb^{-/-} mit der C57Bl6/J GPIIb^{+/+} Gruppe verglichen, indem, wie für die Zellzahl der Intima beschrieben, Gefrierschnitte aus drei Regionen des Ductus arteriosus angefertigt werden. Mittels Ki67-Immunfluoreszenz wird die Anzahl der proliferierenden Zellen innerhalb der Lamina elastica interna ermittelt. Dabei werden nur eindeutig angefärbte Zellkerne als positiv gewertet. Für die Auswertung werden je Gruppe drei Präparate berücksichtigt. Von den beiden Gruppen werden jeweils die Einzelwerte statistisch ausgewertet.

4.8.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der quantitativ zu erfassenden Untersuchungsergebnisse erfolgt mit dem Statistikprogramm Sigma Stat (Sigma Stat 2.0 für Windows, SPSS Inc., San Jose, USA). Morphometrische und immunhistochemische Daten werden mit Kruskal Wallis one way Varianzanalyse nach Rang getestet. Der paarweise Vergleich erfolgt nach der Fisher LSD Methode. Alle Mittelwerte (MW, arithmetisches Mittel) der einzelnen Untergruppen werden aus den Einzelwerten berechnet und \pm SEM (Standard error of the mean) dargestellt. Als statistisch signifikant wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=5\%$ ($p<0,05$) angesetzt.

4.9 Angiographie

Die Angiographie wird in situ durchgeführt um die funktionelle Relevanz von Thrombozyten und SDF-1 alpha für den Verschluss des Ductus arteriosus zu ermitteln. Hierfür wird 12 Stunden post partum die Durchgängigkeit des Ductus arteriosus untersucht. Sie wird bei folgenden Gruppen durchgeführt:

1. GPIIb^{+/+}C57Bl6/J und GPIIb^{-/-} C57Bl6/J
2. anti-GPVI sowie anti-SDF-1 α behandelte Tiere
mit entsprechender Isotypkontrolle
3. NF-E2^{+/+} und NF-E2^{-/-} auch bei zwei und drei Monate
alten Tieren

Für die anti-GPVI- und anti-SDF-1 α -Gruppe wird analog zur unter 4.8.3 beschriebenen Methode vorgegangen. 12 Stunden post partum werden die Tiere mit 22 μ l Midazolam, 22 μ l Fentanyl sowie 3,8 μ l Medetomidin anästhesiert und auf eine Wärmeplatte gelagert. Hierauf erfolgt die Tötung durch zervikale Dislokation, Eröffnung des Thorax und Darstellung des Ductus arteriosus. Die Gefäße werden durch linksventrikuläre Farbinjektion (The Histological Marking System, WAK Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland) dargestellt. Dadurch kann der Verschluss des Ductus arteriosus oder die Patenz beurteilt und über ein Mikroskop (Stemi 2000, Firma Zeiss, Jena, Deutschland) photographiert werden (Canon G5 Kamera, Tokio, Japan).

In den jeweiligen Gruppen wird der Anteil an Tieren mit offenem Ductus arteriosus in Bezug zur Gesamtzahl der untersuchten Tiere in der Gruppe errechnet und als Mittelwert \pm SEM (Standard error of the mean) dargestellt. Zur Varianzanalyse der Gruppen dient die Kruskal Wallis one way Methode nach Rang gefolgt vom Fishers Exakt Test, wobei $p < 0,05$ als signifikant angesehen wird.

4.10 Laser-Mikrodissektion

4.10.1 Prinzip der Laser-Mikrodissektion

Die Laser-Mikrodissektion ist eine Methode, mithilfe derer es möglich ist unterschiedliche Gewebereiche auf histologischen Schnitten zu isolieren, um deren spezifischen DNA-, RNA-, oder Proteinzusammensetzung zu analysieren. Die histologischen Schnitte werden hierfür auf einen Polyethylen-beschichteten Objektträger aufgebracht. Der gewünschte Gewebereich und die Polyethylen-Membran werden mittels eines gepulsten UVA-Stickstoff-Lasers vom umgebenden Gewebe abgetrennt, sodass eine Lücke zwischen den beiden Gewebereichen entsteht. Der Laser weist eine Wellenlänge von 337 Nanometern auf

und beschädigt DNA und Proteine nicht (de With 1995). Durch den Effekt der ablativen Photodekomposition kommt es zudem nicht zur Erwärmung des umgebenden Gewebes (Srinivasan 1986).

Anschließend wird der separierte Gewebebereich durch Laser Pressure Catapulting (LPC) in einen speziell beschichteten Deckel eines Eppendorf-Gefäßes katapultiert. Dadurch wird der gewünschte Gewebeteil kontaktlos isoliert und kann nun weiter analysiert werden. Für die LPC wird der Laser unterhalb des dissezierten Gewebes fokussiert und die Energie im Vergleich zur Mikrodisektion verdoppelt. Durch den dabei entstehenden starken photonischen Druck, wird das Gewebe mit der Polyethylen-Membran in den Deckel des Gefäßes transferiert, der in einer Linie mit dem Laser oberhalb des Objektträgers angebracht ist (Schütze 1998). Dabei bleibt die Morphologie des isolierten Gewebes vollständig erhalten. Die Proben werden dann bei -80°C der RNA-Isolation zugeführt.

4.10.2 Aufbau des Arbeitsplatzes

Das Gerät für die Laser-Mikrodisektion (Palm MicroBeam System, PALM Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) besteht aus einem inversen Zeiss Mikroskop (Axiovert 200 Mikroskop, Firma Zeiss, Jena, Deutschland), einem Laser Generator und einem Computer-gestützten Steuerungselement.

Die Bilder des Mikroskops werden durch eine CCD Videokamera (Color Video Camera 3CCD Sony Tokyo Japan) an einen Computer übertragen, von dem aus auch die Steuerung des Gerätes mittels eines Programms (Palm RoboSoftware 2.2-0103 (DE), PALM Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) erfolgt. Der gepulste UV-Laser mit einer Wellenlänge von 337nm ist durch einen Epifluoreszenzpfad an das Gerät gekoppelt. Der Laserstrahl wird durch das Objektiv fokussiert, wodurch der Laser-Fokus einen Durchmesser von weniger als einem μm erreichen kann (Schütze 1998).

4.10.3 Versuchsdurchführung

Der Ductus arteriosus wird C57Bl6/J-Mäusen zwölf Stunden nach der Geburt wie unter 4.4.2 beschrieben entnommen und weiter behandelt. Die Objektträger werden in den verschlossenen Falcon Tubes auf Raumtemperatur gebracht, anschließend in 70% Ethanol in Wasser für 3 Minuten fixiert. Danach werden sie für 30 Sekunden in eine 0°C kalte 1%ige Cresyl Violet Acetate (Cresyl Violet, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Lösung überführt. Die Präparate werden durch kurzes Spülen in 70% und 100% Ethanol von überflüssiger Färbelösung befreit und entwässert. Alle Lösungen sind auf 0°C gekühlt. Der Objektträger

trocknet für 2 min bei Raumtemperatur bevor er auf dem Mikroskopisch befestigt wird. In den Gefäßhalter werden die Eppendorf-Gefäße (Adhesive Cap, PALM Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) eingespannt und automatisch über den Bereich bewegt, der sich im Fokus des Objektivs befindet. Nun wird bei 20facher Vergrößerung knapp innerhalb der Lamina elastica interna eine zirkulärer Linie gezogen, um das Lumen des Ductus arteriosus von der Gefäßwand isolieren zu können (siehe Abb. 8). Entlang dieser Linie schneidet der Laserstrahl nun durch das Gewebe, sodass eine Lücke zwischen Lumen und Gefäßwand entsteht. Daraufhin wird das separierte Lumen in den bereitgehaltenen Deckel der Eppendorf-Gefäße geschossen. Aus der Media der Gefäßwand wird ein etwa ebenso großer Gewebebereich analog zum oben beschriebenen Vorgehen isoliert und in ein weiteres Eppendorf-Gefäß katapultiert, ohne dass innerhalb der Lamina elastica interna liegende Gewebeabschnitte mitgenommen werden.

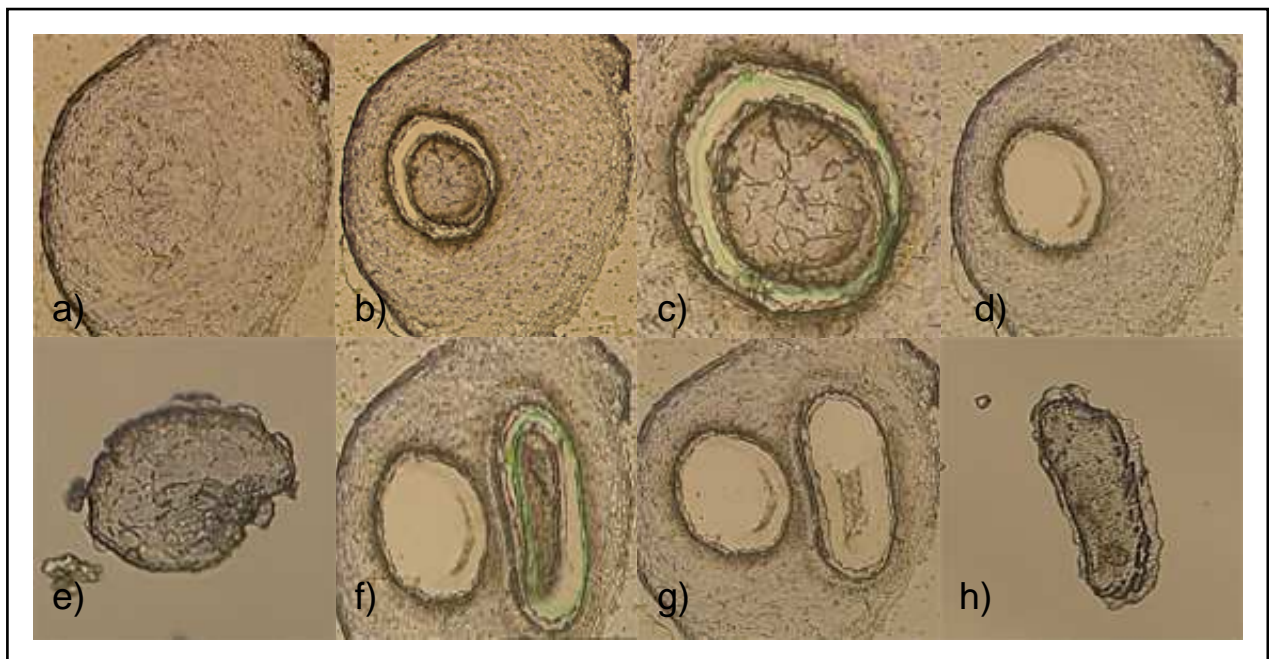
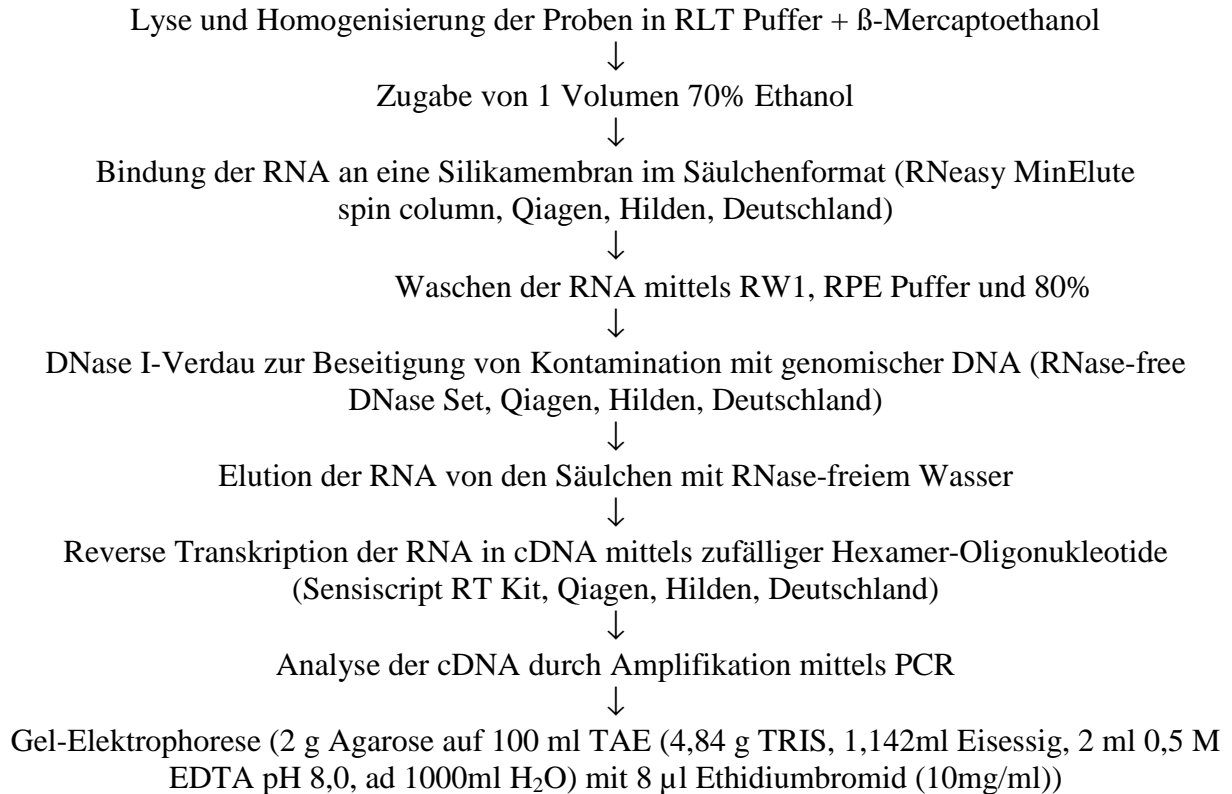


Abbildung 8: Darstellung der Laser-Mikrodissektion des Ductus arteriosus

a) Cresyl-Violett Färbung des Ductus arteriosus **b)** Separation des Bereiches innerhalb der Lamina elastica interna **c)** Detailansicht des separierten Bereiches in Bezug zur grün dargestellten Lamina elastica interna **d)** Der isolierte Bereich wird in ein Eppendorf-Gefäß katapultiert und **e)** kann dort dargestellt werden. **f)** Ein etwa gleich großer Bereich in der Media des Ductus arteriosus wird separiert und **g)** in ein weiteres Eppendorf-Gefäß isoliert. **h)** Dort ist der isolierte Bereich der Media darstellbar.

4.10.4 Auswertung der Proben mittels RT-PCR

Die Proben der Laser-Mikrodissektion werden mittels RT-PCR auf spezifische RNA-Expression hin untersucht. Hierfür wird die RNA wie folgt nach dem Protokoll des Herstellers isoliert (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland):



Um die erfolgreiche RNA-Präparation und cDNA-Synthese zu überprüfen, wird bei allen gewonnenen cDNAs eine Kontroll-PCR mit dem Primer für das Housekeeping-Gen β -Actin durchgeführt. Für die PCR werden folgende Primer verwendet (siehe Tab. 2):

| Primer | vorwärts | rückwärts |
|-------------|--|--|
| VE-Cadherin | 5'-CGT GAA GAA AGA AGA GGC AGA C-3' | 5'-CCT TGG AAA TCA GGG AAG ACA G-3' |
| CD45R | 5'-GGT TGT TCT GTG CCT TGT TC-3' | 5'-GAT AGA TGC TGG CGA TGA TGT C-3' |
| SCA-1 | 5'-GGA GGC AGC AGT TAT TGT GG-3' | 5'-GAG GAC CAT CAG AGC AAG G-3' |
| Alpha-SMA | 5'-TGA AGA GGA AGA CAG CAC AGC-3' | 5'-AGG CAT AGA GGG ACA GCA CAG-3' |
| CD31 | 5'-GTT GTC ATT GGA GTG GTC ATC G-3' | 5'-CCT TCC GTT CTC TTG GTG AGG-3' |
| vWF | 5'-TGC TTC TTA CGC CCA TCT CTG-3' | 5'-ACT CCA TCC TCG CCA ACA CAC-3' |

| | | |
|----------------|--|--|
| ABCG-2 | 5'-TCG CAG AAG GAG ATG TGT TG -3' | 5'-AAA TGG GCA GGT TGA GGT G -3' |
| Flk-1 | 5'-GGA CTC TCC CTG CCT ACC TCA C-3' | 5'-ACG GTG GTG TCT GTG TCA TCT G-3' |
| Prominin1 | 5'-TCC AGC AAA CAA GCA ACA AG-3' | 5'-GTC CGC AAC ATA GCC ACA C-3' |
| β -Actin | 5'-GTC CCT GTA TGC CTC TGG TC-3' | 5'-GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3' |
| c-kit | 5'-GAC TTG CTG GGA CGC TGA C -3' | 5'-CTT GTT GGA CTT GGG TTT CTG -3' |
| CD34 | 5'-TAG TGT CTG CTC CCT GCT TC -3' | 5'-GTC TTC ACC CAG CCT TTC TC -3' |

Tabelle 2: Sequenz der PCR-Primer

5 Ergebnisse

5.1 Mechanismus der Thrombusbildung im Ductus arteriosus

5.1.1 Histologie des Verschlusses des Ductus arteriosus

Um die Dynamik und Morphologie des Verschlusses des Ductus arteriosus sowie das Remodelling der Intima verfolgen zu können, werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Hämatoxylin-Eosin-Färbungen erstellt. Dabei wird zunächst das pränatale Gefäß ausgewertet, da die Relevanz der Ausbildung von Intimakissen für den postnatalen Verschluss bekannt ist und die subendothelialen Zellen Charakteristika undifferenzierter Zellen aufweisen (Gittenberger-De Groot 1980b)(Tada 1990). Im pränatalen Ductus arteriosus sind Intima, Media und Adventitia deutlich abgrenzbar, wobei die Stärke der Gefäßwand vergleichbar der Aorta ist. Das Endothel ist größtenteils einlagig und liegt der Lamina elastica interna unmittelbar an, teilweise sind aber auch Aufwerfungen des Endothels in mehrere Lagen im Sinne von Intimakissen zu beobachten (siehe Abb. 9). Bereits eine Stunde postnatal kommt es zu einer deutlichen Dickenzunahme der Gefäßwand durch ausgeprägte Vasokonstriktion des Ductus arteriosus. Das Lumen ist merklich verengt und es sind mehrere Lagen luminaler Zellen vorhanden, die ganz oder teilweise von der Lamina elastica interna abgelöst sind. Nach zwei und drei Stunden nimmt die Zellzahl der Intima weiter zu und es bilden sich zunehmend mehrere Zellschichten aus, die teilweise durch Ausziehungen mit der Gefäßwand verbunden sind. Die Lumenweite des Ductus arteriosus nimmt durch die zunehmende Vasokonstriktion weiter ab. Das Lumen ist durch den sanduhrförmigen Verlauf des Verschlusses jedoch nur stellenweise obliteriert (Tada 1990). Nach zwölf Stunden ist das Lumen komplett obliteriert und vollständig mit Zellen gefüllt, wobei die Zellzahl im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten weiter zunimmt. Am Randbereich der Lamina elastica interna hat sich eine größtenteils azelluläre Zone gebildet, an die sich lumenwärts zirkulär, parallel ausgerichtete Zellen anschließen, die einen kleinen Zellkern aufweisen. Im zentralen Bereich des Lumens befinden sich größere Zellen, die eine große Zellkern/Zytoplasma-Relation aufweisen. Diese weist auf eine vermehrte metabolische Aktivität dieser Zellen hin, wie dies etwa bei Proteinsynthese oder Proliferation zu beobachten ist. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch der endgültige, anatomische Verschluss des Ductus arteriosus, was eine Veränderung des Phänotyps der luminalen Zellen mit sich bringt (Clyman 1996). Auch 24 Stunden nach Geburt beobachtet man eine weitere Zunahme der Zellzahl innerhalb der Lamina elastica interna; die Gefäßwand zeigt nach wie vor eine maximale Kontraktion. Die Zellkerne erscheinen nun

uniform und sind dicht aneinander gelagert, wobei keine morphologische Differenzierung zwischen peripheren und zentralen Zellen mehr möglich ist.

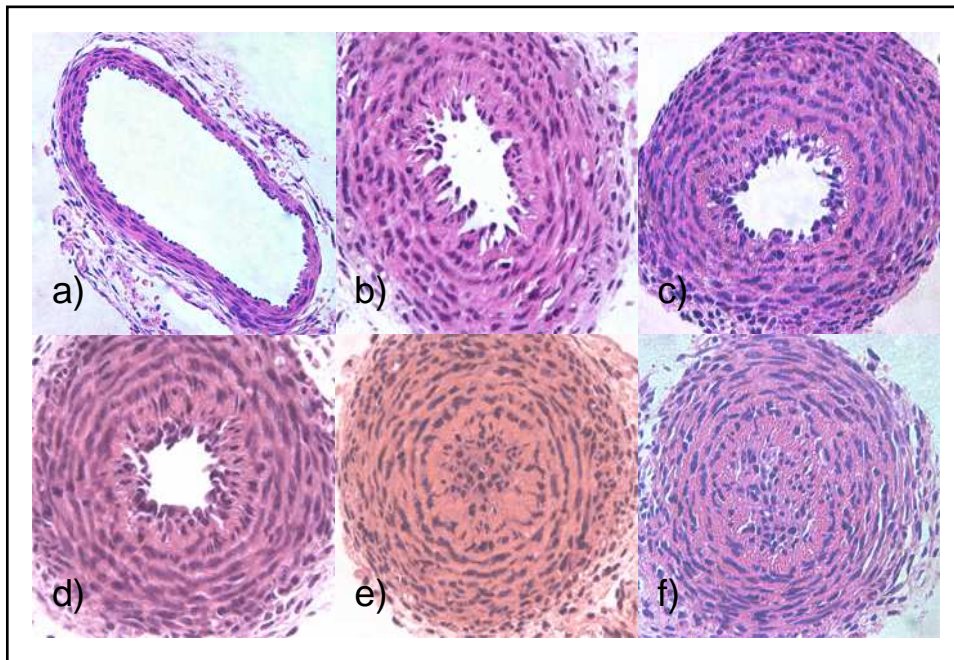


Abbildung 9: Morphologie des Verschlusses des DA im Zeitverlauf

Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Querschnitten des DA. **a)** Pränatal stellt sich der DA als großlumiges, dünnwandiges arterielles Gefäß dar (Vergrößerung 10x) **b)** Bereits eine Stunde postnatal kommt es zur deutlichen Vasokonstriktion mit Verengung des Lumens und merklicher Verdickung der Gefäßwand (Vergrößerung 40x) **c)** Zwei Stunden postnatal ist das Lumen weiter verengt. **d)** Drei Stunden postnatal sind mehrere Zelllagen innerhalb der Lamina elastica interna zu beobachten **e)** Zwölf Stunden postnatal ist das Lumen obliteriert und mit Zellen angefüllt, wobei zentral eher größere und peripher eher kleinere zirkulär angeordnete Zellkerne zu beobachten sind **f)** Nach 24 Stunden nimmt die Zellzahl innerhalb der Lamina elastica interna weiter zu und es kommt zum Remodelling des Lumens

5.1.2 Thrombozyten und Substrate der Thrombusbildung

Bisher liegen in der Literatur kaum Erkenntnisse über eine mögliche Rolle von Thrombozyten im Rahmen des Verschlusses des Ductus arteriosus vor. Daher wird im folgenden Schritt im Detail untersucht, ob Thrombozyten während des Verschlusses des Ductus arteriosus lokal adhären bzw. welche möglichen Liganden ihnen für den Prozess der Adhäsion an der Gefäßwand zur Verfügung stehen. Als wichtige Bindungspartner sind vWF und Kollagen bekannt, die mit den thrombozytären Adhäsionsmolekülen GPIb-alpha und GPIIb/IIIa bzw. GPVI interagieren (Ruggeri 1997b). Dabei induziert Kollagen über die Interaktion mit GPVI die Aktivierung der Thrombozyten, was wiederum deren Aggregation durch Vernetzung mittels Fibrin über GPIIb/IIIa ermöglicht (Nieswandt 2001b)(Savage 1998). Im folgenden werden die Substrate und der Zeitverlauf der Thrombusbildung im Ductus arteriosus näher dargestellt.

Um Thrombozyten im Ductus arteriosus identifizieren zu können wird, ein Antikörper gegen CD41 verwendet. Bereits nach einer Stunde ist ein okkludierender Thrombus im freien Lumen zu sehen und die adhärierenden Zellen sind von Thrombozyten umgeben (siehe Abb. 10). Auch ist eine Auflagerung von vWF auf das Endothel zu sehen, der sich auch zwischen den adhärierenden Zellen befindet. Fibrinogen/Fibrin ist weniger auf den Endothelzellen, als vielmehr in einer interzellulären Verteilung innerhalb des Lumens zu finden. Kollagen Typ I ist in unmittelbarem Kontakt zu den luminalen Zellen. Dies weist eine Zerstörung der Endothelintegrität nach, wodurch Thrombozyten mit der stark thrombogenen exponierten subendothelialen Matrix in Kontakt kommen können. Nach zwölf Stunden sind weniger Thrombozyten vorhanden, die sich nun um das Zentrum des Lumens konzentrieren. Das gesamte obliterierte Lumen ist im interzellulären Bereich schwach positiv für vWF mit einer Betonung in der Peripherie. Dagegen ist Fibrin vermehrt im zentralen Bereich des Lumens zu finden, wobei im Vergleich zu einer Stunde post partum eine abgeschwächte Anfärbung zu beobachten ist. Nach 24 Stunden kommt es zur Abnahme von Thrombozyten und vWF bei gleichbleibender räumlicher Verteilung, Fibrin ist kaum noch anfärbbar. Damit kann hier erstmals gezeigt werden, dass Thrombozyten bereits eine Stunde postnatal im Lumen des Ductus arteriosus zu finden sind und vWF, Kollagen Typ I und Fibrinogen/Fibrin als Liganden für Adhäsion, Aktivierung und Aggregation vorhanden sind. Dies hat die Bildung eines okkludierenden Thrombus zur Folge, der im Verlauf des Verschlusses organisiert und von luminalen Zellen durchsetzt wird.

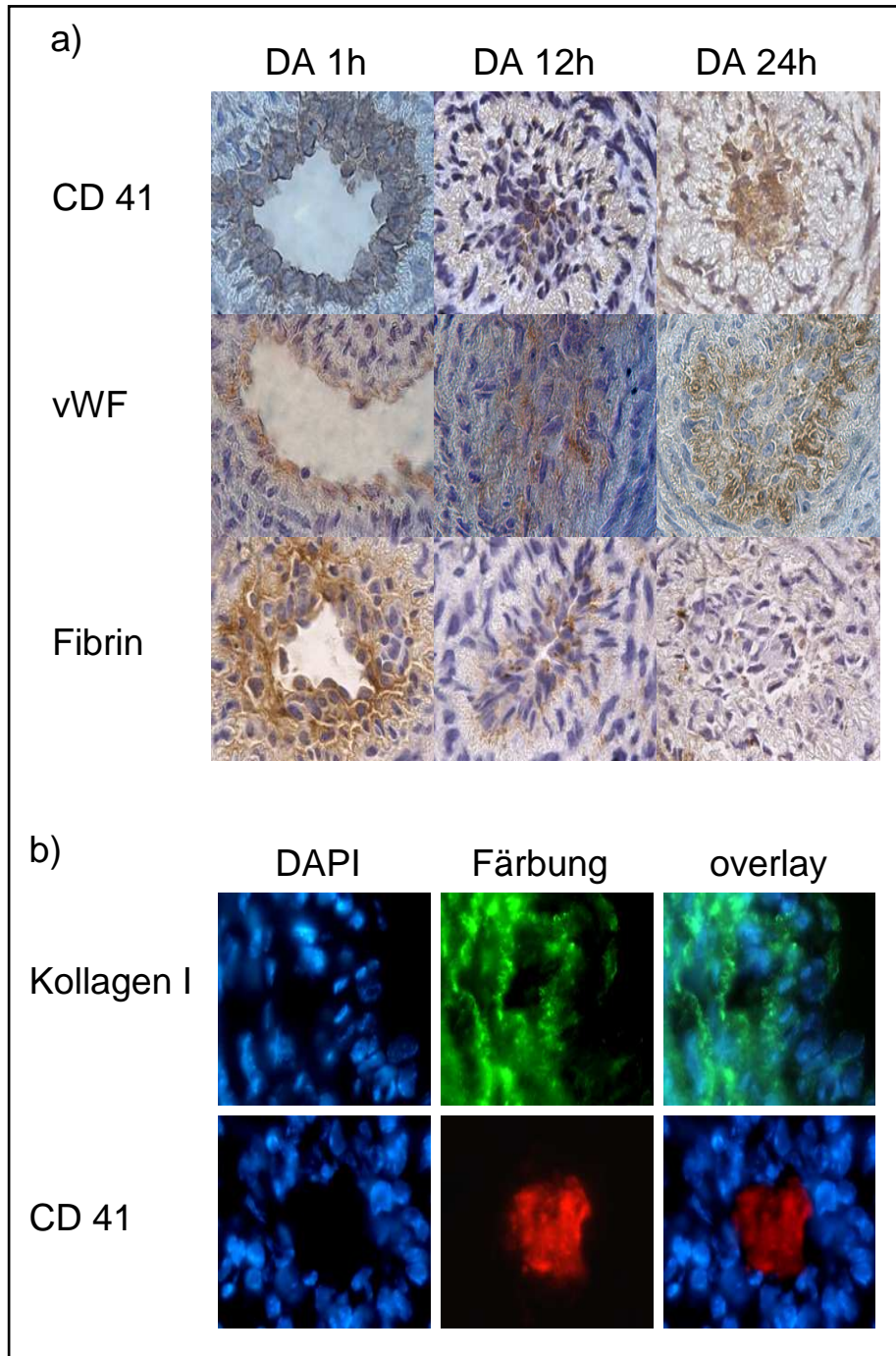


Abbildung 10: Thrombozyten und Substrate der Thrombusbildung im DA

a) Immunhistologie des DA: Bereits eine Stunde postnatal sind CD41⁺ Thrombozyten im Lumen nachweisbar, ebenso wie dem Endothel aufgelagerter vWF sowie interzelluläres Fibrin/Fibrinogen. Zwölf Stunden postnatal kommt es zur Organisation des Thrombus; Fibrin/Fibrinogen sowie Thrombozyten sind nur noch zentral zu beobachten, während vWF eher in der Peripherie des Lumens bleibt. Nach 24 Stunden ist eine ähnliche Verteilung zu beobachten, Fibrin ist kaum noch nachweisbar. **b)** Immunfluoreszenz des DA eine Stunde postnatal: Kollagen Typ I ist in direktem Kontakt mit luminalen Zellen, in der CD41 Färbung ist im Lumen ein okkludierender Thrombus nachweisbar.

5.2 Einfluss von Thrombozyten auf Verschluss und Zellzahl des Ductus arteriosus

5.2.1 Erhöhte Inzidenz des PDA bei Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion

Da sowohl Thrombozyten als auch Substrate der Thrombusbildung im Lumen des Ductus arteriosus vorhanden sind, stellt sich die Frage der funktionellen Relevanz dieser Beobachtungen für den postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus. Um zu ermitteln, ob die Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion funktionelle Auswirkungen auf den Verschluss des Ductus arteriosus hat, wird der Status des Ductus arteriosus 12 Stunden nach Geburt angiographisch evaluiert. Dabei weisen alle C57Bl6/J Wildtyp-Mäuse (20/20) sowie alle Isotyp-Antikörper (15/15) behandelten GPIIb^{+/+} C57Bl6/J Wildtyp-Mäuse zu diesem Zeitpunkt einen vollständig geschlossenen Ductus arteriosus auf (siehe Abb. 11). Dies ist konsistent mit eigenen histologischen Untersuchungen sowie den Befunden anderer Autoren (Tada 1990). Dagegen ist der Ductus arteriosus bei der anti-GPVI-Gruppe 12 Stunden nach Geburt immer noch in 54% (7/13) der Fälle persistierend. Auch in der GpIIb^{-/-} C57Bl6/J Gruppe findet man bei 31% (5/16) einen persistierenden Fluss im Ductus arteriosus, was darauf hindeutet, dass sowohl GPIIb als auch GPVI eine wichtige Rolle beim Verschluss des Ductus arteriosus spielen.

Der stärkste Effekt auf den Verschluss des Ductus arteriosus ist bei NF-E2^{-/-} Mäusen zu beobachten, bei denen eine Thrombozytendefizienz vorliegt (Shivdasani 1995b). So erweist sich der Ductus arteriosus bei der angiographischen Untersuchung in 69% der Fälle (9/13) als offen. Dagegen zeigt sich bei allen NF-E2^{+/+} Tieren (7/7) ein kompletter Verschluss. Auch bei 2-3 Monate alten NF-E2^{-/-} Tieren ist in 25% (2/8) der Fälle weiterhin ein PDA nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass die Thrombozytopenie den Verschluss des Ductus arteriosus nicht nur vorübergehend in der Postnatalperiode beeinträchtigt, sondern auch langfristig zu einem PDA führt. Damit kann gezeigt werden, dass Adhäsion und Akkumulation von Thrombozyten für die Obliteration des luminalen Flusses im Ductus arteriosus funktionell relevant sind.

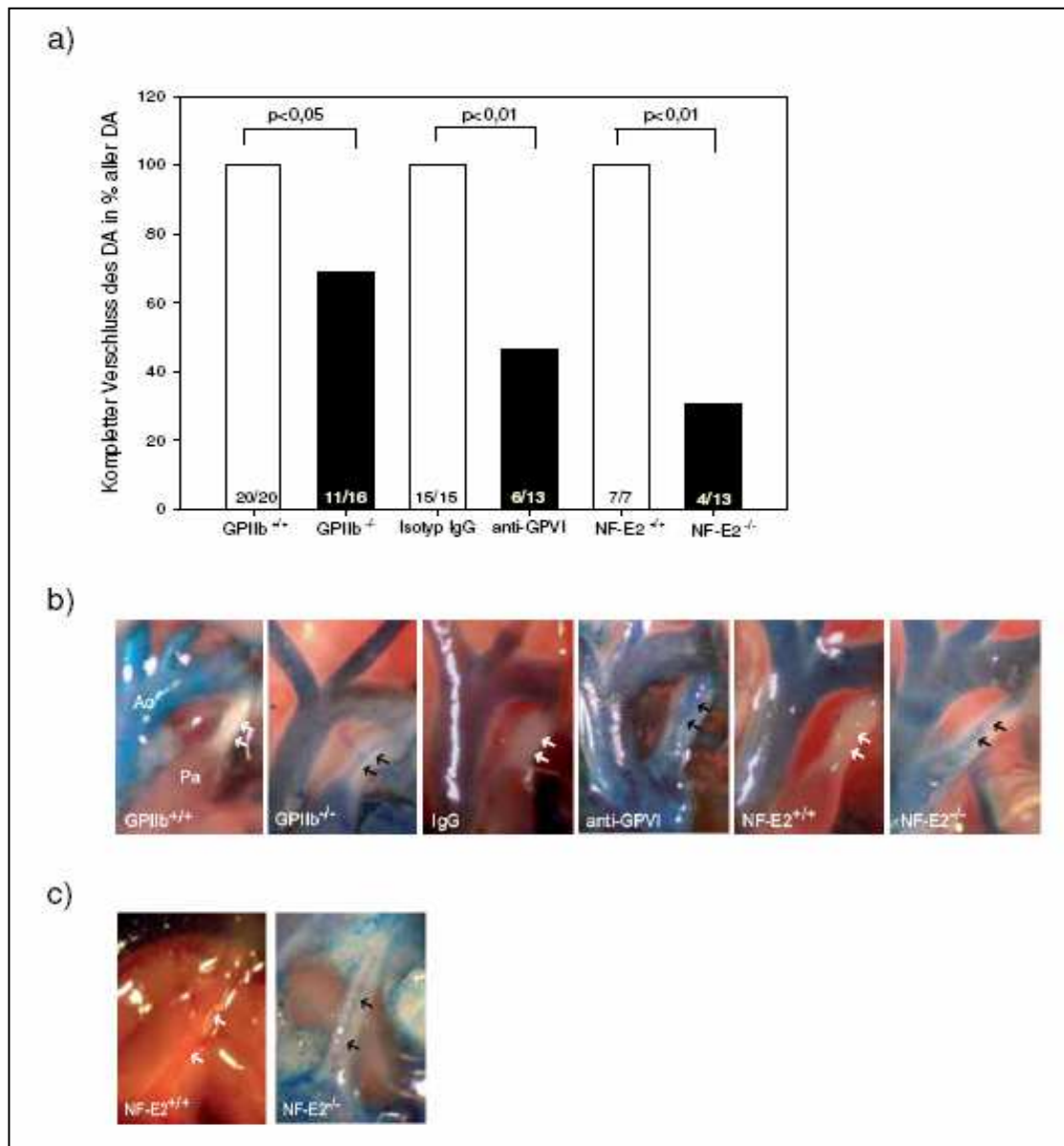


Abbildung 11: Angiographie des DA

a) Angiographische Untersuchung des DA 12 Stunden postnatal. Der Anteil der Tiere mit verschlossenem DA in den jeweiligen Gruppen unterscheidet sich signifikant zur Kontrollgruppe. **b)** Repräsentative in situ Bilder des DA im Bereich zwischen A. pulmonalis (Pa) und Aorta (Ao) der einzelnen Gruppen nach intraventrikulärer Injektion eines blauen Farbstoffs. Weiße Pfeile zeigen einen verschlossenen DA an, schwarze Pfeile einen offenen DA mit persistierendem Fluss. **c)** Bei der adulten NF-E2^{+/+} Maus ist die Umwandlung in eine ligamentäre Struktur zu beobachten, bei der NF-E2^{-/-} Maus hingegen ein persistierender DA.

5.2.2 Morphologie des Ductus arteriosus beim $GpIIb^{-/-}$, GPVI-Antikörper und NF-E2^{-/-} Modell

Thrombozyten spielen im pathophysiologischen Gefäßremodelling im adulten Organismus eine maßgebliche Rolle. Im folgenden Abschnitt wird daher untersucht, inwiefern die beobachtete Akkumulation von Thrombozyten im Ductus arteriosus Einfluss auf das konsekutive Remodelling des Gefäßes hat. Denn durch Adhäsion und Aktivierung führen Thrombozyten nicht nur zum thrombotischen Gefäßverschluss, sondern induzieren darüber hinaus über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine die Rekrutierung zirkulierender Zellen sowie die Migration glatter Muskelzellen aus der Gefäßwand (Gawaz 2008)(Massberg 2005)(Massberg 2006).

Um den Einfluss der Thrombozyten auf Verschluss und intimales Remodelling des Ductus arteriosus 12 Stunden postnatal zu analysieren zu können, werden Hämatoxylin-Eosin Präparate des Gefäßes von anti-GPVI behandelten, $GPIIb^{-/-}$ und NF-E2^{-/-} sowie entsprechender Kontrollen angefertigt und histomorphologisch ausgewertet. Alle Kontrolltiere weisen eine Verdickung der Gefäßwand durch Vasokonstriktion auf, das Lumen ist obliteriert und mit Zellen ausgefüllt, wobei peripher vorwiegend kleine und zentral große Zellen mit einer großen Zellkern/Zytoplasma Relation zu finden sind (siehe Abb. 12). Hingegen ist bei den $GPIIb^{-/-}$ Mäusen das Lumen zwar überwiegend obliteriert und das Ausmaß der Vasokonstriktion entspricht den Wildtypen, das Lumen aber ist nicht ganz von Zellen ausgefüllt und es zeigen sich azelluläre Räume. Auch ist die Akkumulation großer Zellen nicht in dem Maße ausgeprägt, wie dies bei den Kontrollen der Fall ist. Weiterhin zeigen drei von fünf GPVI-Antikörper behandelten Tieren ein offenes Lumen, das in seiner Morphologie eher einem drei Stunden alten Ductus arteriosus entspricht. Zwar ist die Gefäßwand stark kontrahiert, aber der zentrale Bereich des Lumens ist nicht verschlossen, sodass sich in der Peripherie mehrere Zelllagen finden, die teilweise durch Ausziehungen in das freie Lumen hineinragen. Bei den verschlossenen Präparaten sind die luminalen Zellen im Vergleich zu den Kontrollen weniger dicht gepackt, doch führen sie zu einer Obliteration des Lumens.

Die NF-E2^{+/+} Wildtyp Mäuse sind von C57Bl6/J Wildtypen morphologisch nicht zu unterscheiden. Bei den NF-E2^{-/-} Mäusen weisen sechs von sieben Tieren ein offenes oder nicht vollständig verschlossenes Lumen auf. Hier findet man keine vollständige Kontraktion der glatten Muskulatur der Gefäßwand, sodass die Zunahme der Wanddicke geringer ausfällt. Das Lumen ist durch die vorangegangene Angiographie blau eingefärbt und es sind freie Zellen ohne Kontakt zum Endothel zu sehen. Die luminalen Zellen mit Kontakt zur

Gefäßwand sind größtenteils einlagig und nicht mehrlagig, wie dies bei Wildtypen bereits nach einer Stunde zu beobachten ist. Vereinzelt adhären Zellen am Endothel, das dicht auf der Lamina elastica interna aufliegt. Somit ist bei NF-E2^{-/-} Mäusen sowohl die Vasokonstriktion als auch die intimale Zellakkumulation stark beeinträchtigt und damit einhergehend das Remodelling des Ductus arteriosus weitestgehend aufgehoben.

Zusammenfassend kann hier gezeigt werden, dass die Beeinträchtigung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie die Thrombozytopenie zu einer erheblichen Veränderung in der Morphologie des Ductus arteriosus während der postnatalen Adaptation führen. Die Effekte sind bei NF-E2^{-/-} Mäusen am stärksten ausgeprägt, weil diese Tiere fast keine Thrombozyten aufweisen. Dagegen führt die Inhibition bzw. Deletion eines Thrombozytenrezeptors zu ähnlichen, wenn auch weniger ausgeprägten morphologischen Veränderungen im postnatalen Verlauf.

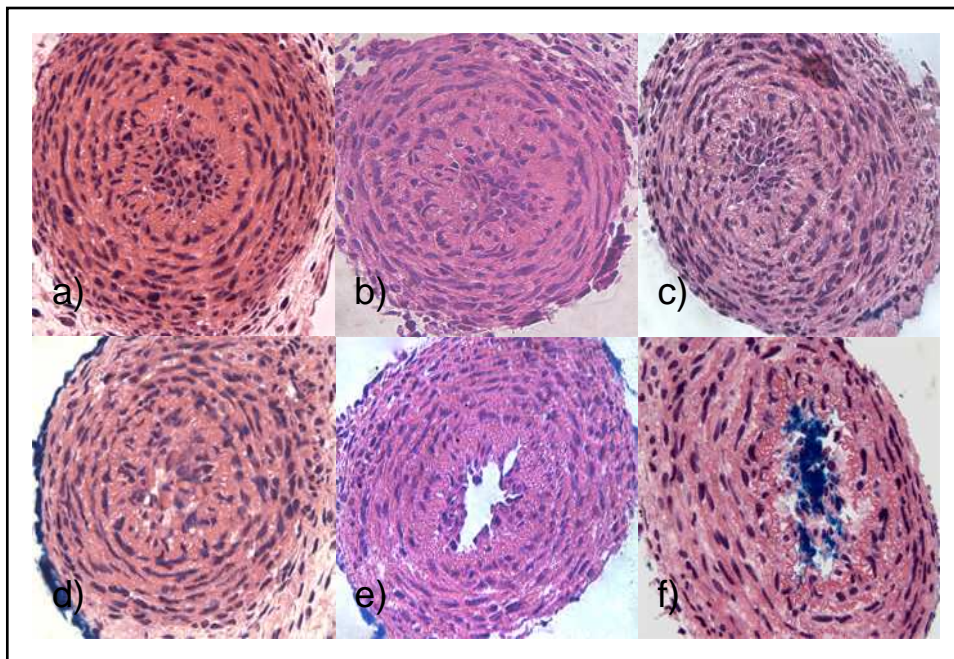


Abbildung 12: Morphologie des DA nach Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion
 Repräsentative HE-Färbungen des DA 12 Stunden postnatal **a)** Die GPIIb^{+/+} C57Bl6/J Tiere weisen ein vollständig obliteriertes Lumen auf, das dicht mit Zellen gefüllt ist. **b)** Die C57Bl6/J Isotyp Gruppe sowie die **c)** NF-E2^{+/+} Gruppe weisen die gleiche Morphologie auf. **d)** Bei den GPIIb^{-/-} C57Bl6/J Tieren ist das Lumen zentral weniger dicht mit Zellen gefüllt, aber obliteriert. **e)** Die anti-GPVI Gruppe weist ein offenes Lumen auf, wobei am Endothel mehrere Zellschichten zu finden sind. **f)** Bei den NF-E2^{-/-} Mäusen ist das Lumen weit offen, die Gefäßwand nicht maximal kontrahiert und das Endothel größtenteils einlagig.

5.2.3 Reduzierung der intimalen Zellzahl im GpIIb^{-/-}, GPVI-Antikörper und NF-E2^{-/-} Modell

In einem weiteren Schritt wird die Anzahl intimaler Zellen im Ductus arteriosus 12 Stunden nach Geburt in den unter 5.2.2. genannten Gruppen quantifiziert. Diese Modelle werden bezüglich der intimalen Zellzahl in Relation zur Fläche innerhalb der Lamina elastica interna mit Kontrolltieren verglichen. Für die NF-E2^{-/-} Mäuse dienen NF-E2^{+/+} Geschwistertiere als Kontrollen, da diese keinen C57Bl6/J Hintergrund aufweisen.

Bei den C57Bl6/J Mäusen kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp (n=8) und den Isotyp Mäusen (n=5) bezüglich der Zellzahl festgestellt werden (p=0,801). Beide weisen im Mittelwert die höchsten Zellzahlen pro Fläche mit 22643 Zellen/cm² für die Wildtypen und 22127 Zellen/cm² für die Isotyp-Kontrollen auf (siehe Abb. 13). Zwischen den Wildtyp Mäusen und der GPVI-Antikörper Gruppe (n=5) mit 17778 Zellen/cm² (p= 0,023) und der GPIIb^{-/-} Gruppe (n=7) mit 16093 Zellen/cm² (p=0,001) kann eine signifikante Reduzierung der neointimalen Zellzahl nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Isotyp Gruppe kommt es zur Abnahme der Zellzahl in der GPVI-Antikörper Gruppe, die allerdings nicht signifikant ausgeprägt ist (p= 0,063). Bei den NF-E2 Mäusen zeigt sich eine starke Reduzierung der Zellzahl mit einer hohen Signifikanz (p<0,001). Die Wildtypen (n=6) weisen 18612 Zellen/cm², die knock out Tiere (n=7) 6589 Zellen/cm² in der Intima auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition bzw. Deletion thrombozytärer Adhäsionsrezeptoren zu einer Reduktion der intimalen Zellzahl führt. Am deutlichsten ist dieser Effekt bei NF-E2^{-/-} Mäusen zu beobachten, die unter einer ausgeprägten Thrombozytopenie leiden.

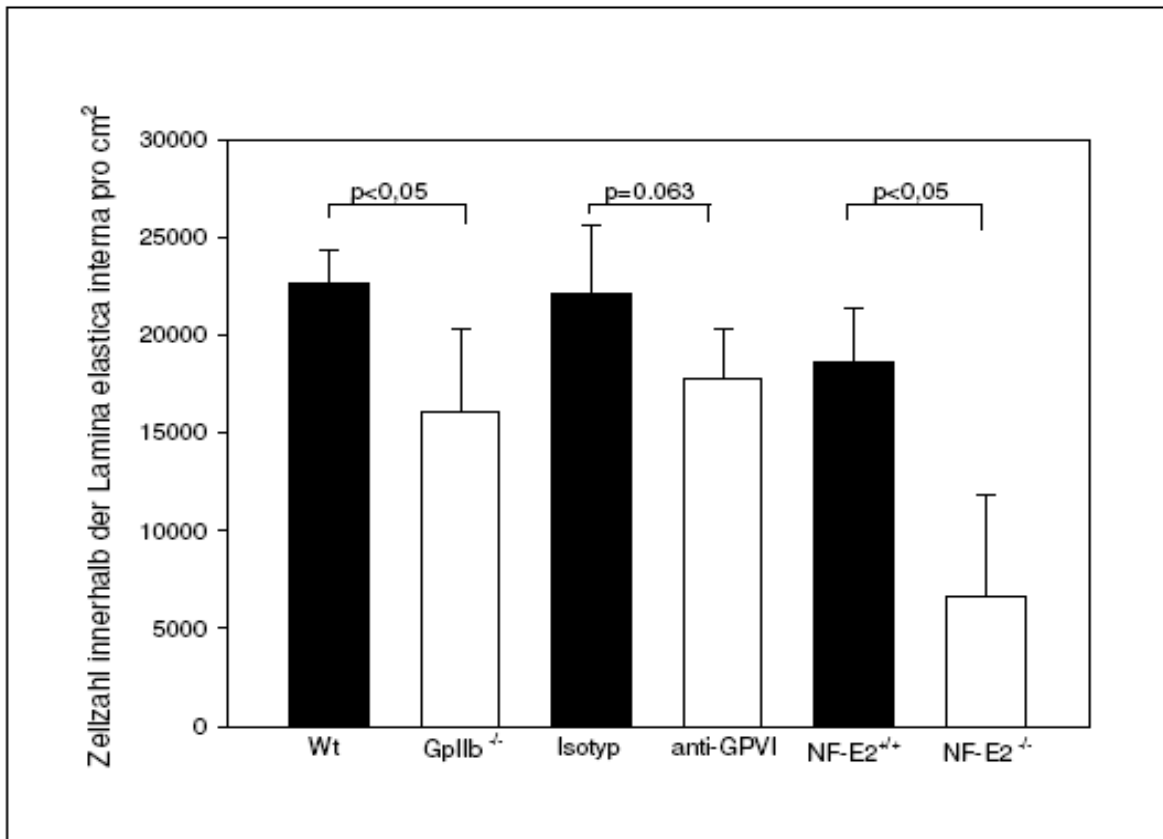


Abbildung 13: Zellzahl im DA innerhalb der Lamina elastica interna

Dargestellt ist die Zellzahl im DA innerhalb der Lamina elastica interna 12 Stunden postnatal. Wildtyp (Wt) und Isotyp unterscheiden sich nicht signifikant, während zwischen Wt, anti-GPVI und GPIIb⁻ ein signifikanter Unterschied besteht. Im Vergleich zum Isotyp ist bei anti-GPVI kein signifikanter Unterschied zu sehen. Die Zellzahl der NF-E2 wt und NF-E2⁻ Gruppe unterscheiden sich hoch signifikant.

5.2.4 Reduzierung der Proliferationsrate im GPIIb⁻ Modell

Anschließend wird analysiert, ob Thrombozyten die Proliferation intimaler Zellen im postnatalen Ductus arteriosus beeinflussen. Hierzu wird mittels Ki67 Immunfluoreszenz die Anzahl proliferierender Zellen innerhalb der Lamina elastica interna quantifiziert, um die Auswirkungen des knock outs des wichtigsten thrombozytären Aggregationsrezeptors GPIIb auf das Proliferationsverhalten zu ermitteln. Dabei werden jeweils n=3 zwölf Stunden alte Ductus arteriosi von GPIIb^{+/+} C57Bl6/J und GPIIb⁻ C57Bl6/J Mäusen nach standardisiertem Protokoll analysiert. Hierbei zeigt sich eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen innerhalb der Lamina elastica interna (p<0,001), bei GPIIb^{+/+} Wildtypen mit im Mittelwert n=19,6 im Vergleich zu GPIIb⁻ Mäusen mit n=11,5 proliferierenden Zellen (siehe Abb. 14). Die Proliferation außerhalb der Lamina elastica interna hat in beiden Gruppen ein vergleichbares Ausmaß.

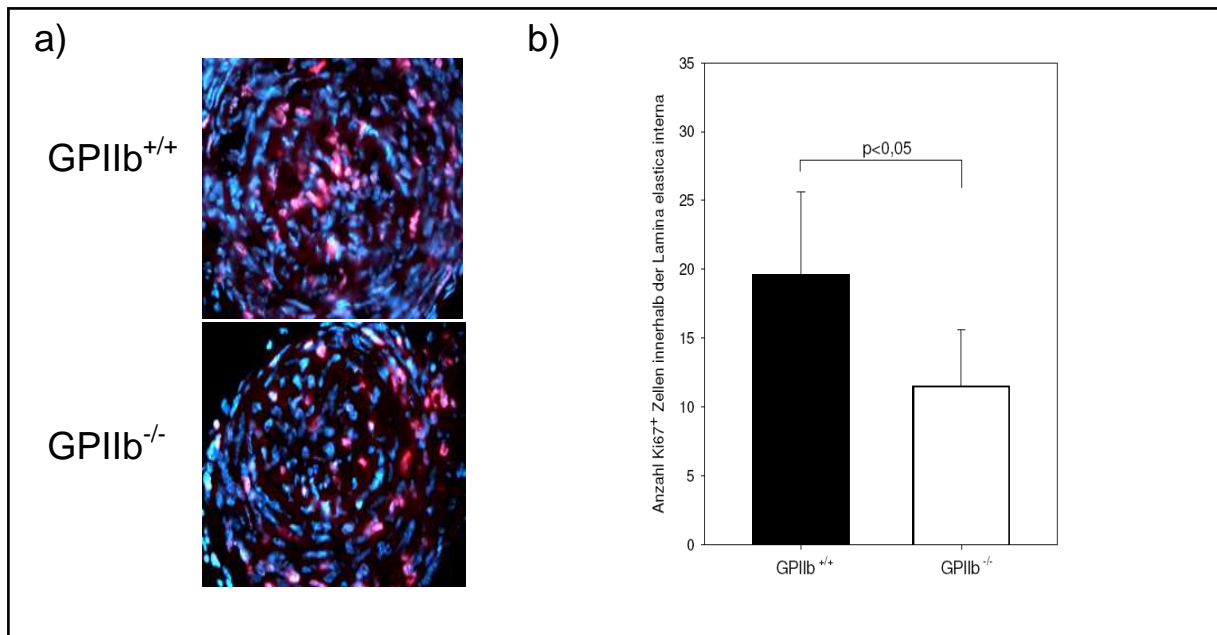


Abbildung 14: Proliferation im DA im Vergleich zwischen GPIIb^{+/+} und GPIIb^{-/-}

a) Repräsentative Ki67 Immunfluoreszenz-Bilder des DA 12 Stunden postnatal. Ki67⁺ Zellen weisen eine rote nukleäre Färbung auf, Zellkerne sind mit DAPI in blau angefärbt. In der GPIIb^{+/+} Gruppe sind zentral im Lumen deutlich mehr proliferierende Zellen zu beobachten.
b) Quantifizierung der Ki67⁺ Zellen innerhalb der Lamina elastica interna. Die beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant (p<0,001)

5.3 Charakterisierung der Neointimabildung im Ductus arteriosus

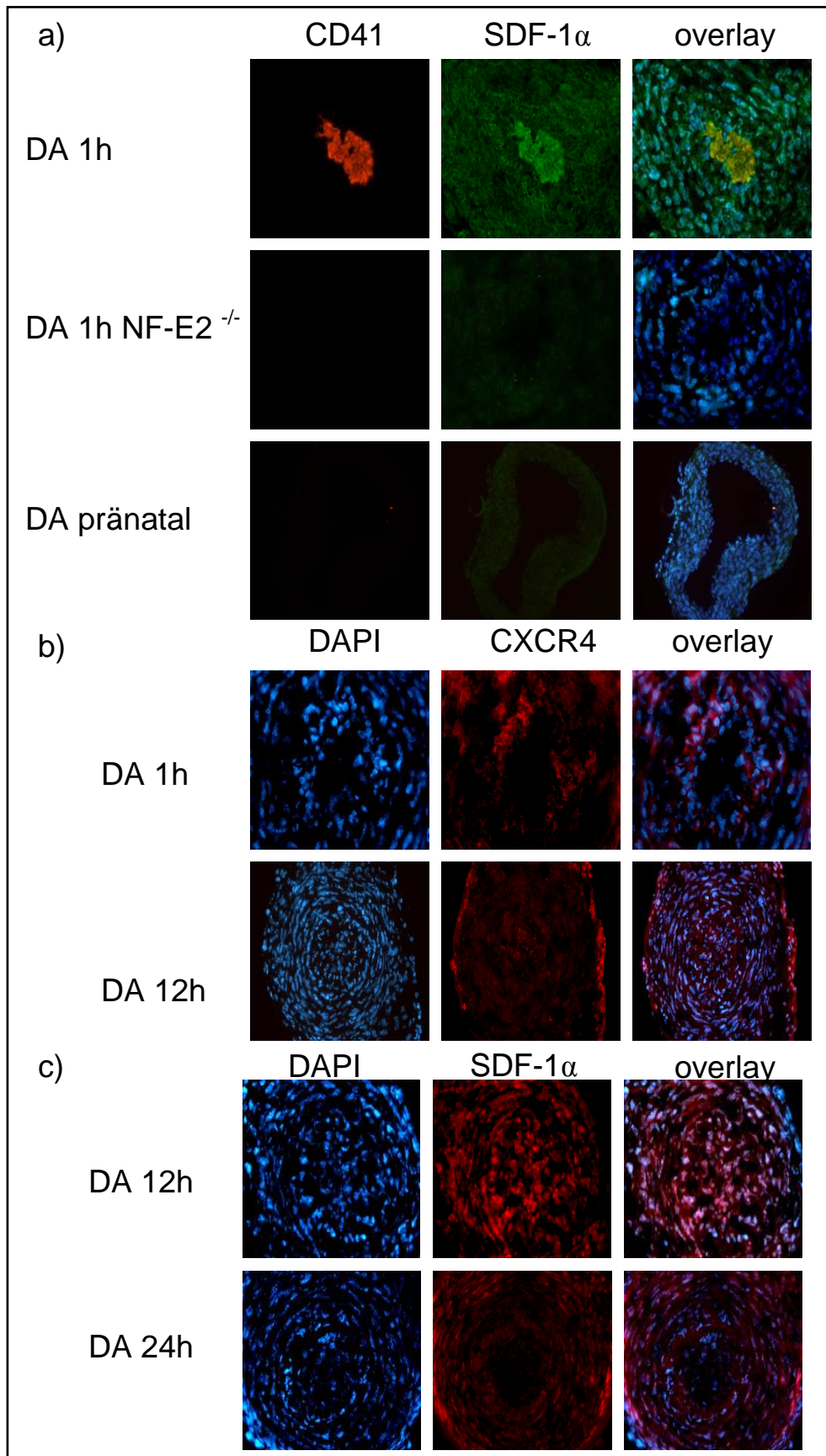
5.3.1 SDF-1/CXCR4 Expression im Ductus arteriosus

Von der SDF-1/CXCR4 Achse ist bekannt, dass sie wegen der Rekrutierung von Progenitorzellen ein wichtiger Faktor für die Neointimabildung ist (Zernecke 2005). Hierbei kommt Thrombozyten eine Schlüsselrolle zu, da sie nach Gefäßverletzungen sehr schnell rekrutiert werden (siehe Abb. 4). Dort sezernieren die aktivierten Thrombozyten SDF-1 α in das lokale Mikromilieu und vermitteln dadurch die Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen (Jin 2006)(Massberg 2006). Im weiteren Verlauf wird dieses Chemokin bei Gefäßverletzungen und atherosklerotischen Plaques auch von glatten Muskelzellen der Gefäßwand vermehrt exprimiert (Abi-Younes 2000)(Zhang 2006).

Wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, beeinflussen Thrombozyten das intimale Remodelling des Ductus arteriosus. Im folgenden wird deshalb näher untersucht, ob Thrombozyten über die Sekretion von SDF-1 α am Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt sind. Bereits pränatal ist eine leichte Expression von SDF-1 α in der Gefäßwand zu finden, im Lumen jedoch sind weder Thrombozyten noch SDF-1 α nachweisbar (siehe Abb. 15). Innerhalb einer Stunde postnatal ist SDF-1 α im Lumen stark exprimiert, wobei es sich in einer Doppelfärbung mit CD41 in Thromben innerhalb des freien Lumens colokalisieren lässt.

Damit sind Thrombozyten zu diesem frühen Zeitpunkt eine wichtige Quelle für SDF-1 α im Ductus arteriosus. Die glatten Muskelzellen der Media zeigen im Vergleich zur pränatalen Situation eine vermehrte Expression von SDF-1 α . Beim SDF-1 Rezeptor CXCR4 ergibt sich eine Stunde postnatal eine Anfärbung der Mehrzahl der luminalen Zellen, die Zellen der Media dagegen weisen lediglich eine schwache Expression auf. Pränatal und bei NF-E2^{-/-} Tieren ist eine Stunde post partum hingegen luminal kein SDF-1 α nachweisbar. Nach zwölf Stunden hat die SDF-1 α Expression vor allem in der Gefäßwand, aber auch im Lumen stark zugenommen. CXCR4 ist immer noch im Lumen zu finden, wo nun fast alle Zellen positiv für CXCR4 sind. In der Gefäßwand nimmt die CXCR4 Expression zu, sodass die meisten Zellen angefärbt sind. Im 24 Stunden alten Ductus arteriosus sind SDF-1 α und CXCR4 nur noch schwach anfärbbar, wobei SDF-1 α nur noch in der Gefäßwand exprimiert wird. Eine Beteiligung der SDF-1/CXCR4-Achse am Verschluss des Ductus arteriosus erscheint deshalb als sehr wahrscheinlich.

Um die funktionelle Relevanz der SDF-1/CXCR4-Achse in vivo beim Verschluss des Ductus arteriosus zu analysieren, wird die Durchgängigkeit des Ductus arteriosus zwölf Stunden post partum nach Gabe eines anti-SDF-1 α Antikörpers angiographisch untersucht. Hierfür wird den trächtigen Tieren innerhalb von zwölf Stunden vor der erwarteten Geburt ein IgG-Antikörper bzw. Isotyp-Antikörper intraperitoneal injiziert. Bei allen (15/15) Tieren, die den Isotyp-Antikörper erhalten hatten, ist der Ductus arteriosus vollständig verschlossen. Bei der anti-SDF-1 α Gruppe zeigt sich hingegen, dass 50% (5/10) der Tiere einen offenen Ductus arteriosus aufweisen. Damit kann in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Thrombozyten in der frühen Phase des Verschlusses des Ductus arteriosus eine wichtige Quelle für SDF-1 α darstellen und luminal CXCR4⁺ Zellen zu beobachten sind. Tatsächlich führt die Störung der SDF-1/CXCR4-Achse in der perinatalen Phase durch blockierende Antikörper bei 50% der Tiere zu einem persistierenden Ductus arteriosus.



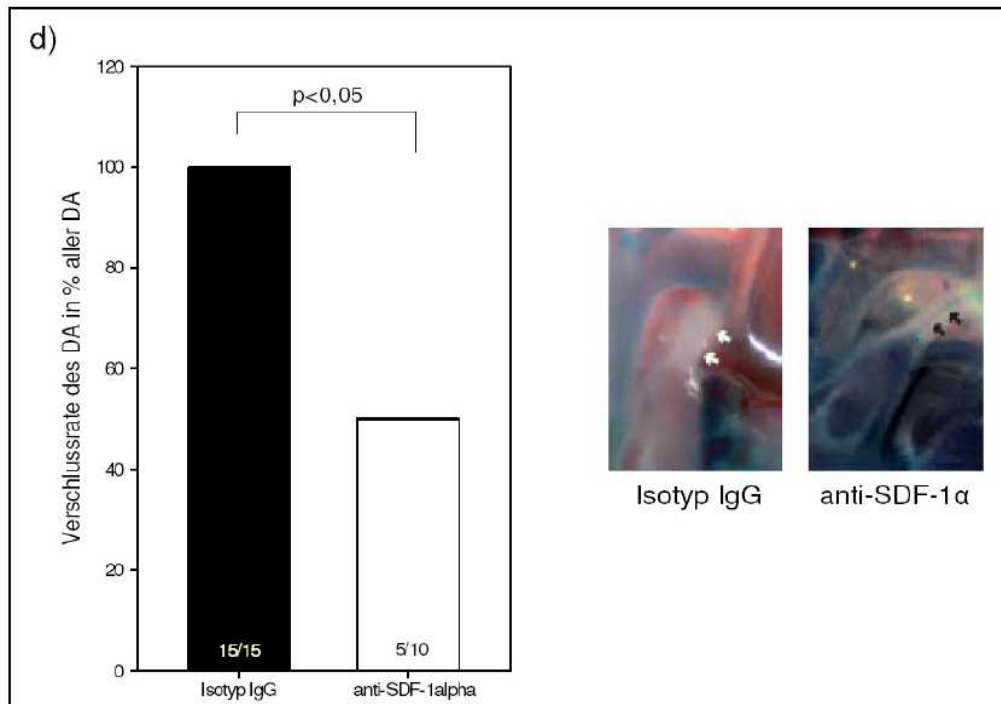


Abbildung 15: Beteiligung der SDF-1/CXCR4-Achse am Verschluss des DA

a) Eine Stunde postnatal ist SDF-1 α im DA nachweisbar, wobei sich in der Doppelfärbung mit CD41 Thrombozyten als wichtige Quelle identifizieren lassen. Pränatal und in der NF-E2^{-/-} Maus ist lediglich eine schwache SDF-1 α Färbung in der Gefäßwand zu erkennen, im Lumen sind weder SDF-1 α noch CD41 nachweisbar. **b)** Auf luminalen Zellen und in der Gefäßwand lässt sich der SDF-1 Rezeptor CXCR-4 nachweisen **c)** Im Zeitverlauf nimmt die SDF-1 α Expression im gesamten DA zunächst zu und ist nach 24 Stunden nur noch in der Gefäßwand nachweisbar. **d)** Angiographie: In der anti-SDF-1 α Gruppe kommt es zwölf Stunden postnatal signifikant seltener zum kompletten Verschluss des DA. Repräsentative in situ Bilder des DA nach intraventrikulärer Injektion eines blauen Farbstoffs. Weiße Pfeile zeigen einen verschlossenen DA an, schwarze Pfeile einen offenen DA mit persistierendem Fluss.

5.3.2 Expression von Oberflächenmarkern und Proliferation im Rahmen des intimalen Remodellings

Da die oben erläuterten Ergebnisse nahelegen, dass Thrombozyten nicht nur durch Bildung eines okkludierenden Thrombus, sondern auch durch ihren Einfluss auf das intimale Remodelling am Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt sind, werden im folgenden Abschnitt die zellulären Abläufe im Detail untersucht. Um die Zellen im Ductus arteriosus anhand von Oberflächenmarkern näher charakterisieren zu können werden immunhistologische und fluoreszenzmikroskopische Methoden sowie Laser-Mikrodissektion mit anschließender rtPCR der isolierten Gewebeabschnitte eingesetzt. Folgende Oberflächenproteine werden auf ihre Expression und Lokalisation hin überprüft:

1. CD31 (PECAM-1) und CD144 (VE-Cadherin) als endotheliale Marker
2. CD34, flk-1 (VEGFR2) und ABCG-2 (BCRP) als Marker, die sowohl auf differenzierten Endothelzellen als auch auf endothelialen Vorläuferzellen exprimiert werden (Peichev 2000)(Shi 1998)
3. CD133, ein Marker von wenig differenzierten endothelialen Vorläuferzellen (Urbich 2004)
4. Sca-1 und c-kit, als Marker mesenchymaler bzw. hämatopoietischer Vorläuferzellen (Saiura 2001)
5. CD45 als panleukozytärer Marker
6. sm-Aktin als Marker glatter Muskelzellen

Im eine Stunde alten Ductus arteriosus finden sich im Endothel die typischen Marker CD31 und VE-Cadherin (siehe Abb. 16). Diese weisen in der Doppelfärbung ein überlappendes Verteilungsmuster auf, sodass die peripheren Zellen des Lumens CD31⁺VE-Cadherin⁺ sind, während die zentralen Zellen keine Endothelmarker exprimieren. Die luminal des Endothels liegenden Zellen sind also CD31⁻VE-Cadherin⁻. Vereinzelt sind dort CD45⁺ Zellen zu finden, sm-Aktin wird von den luminalen Zellen nicht exprimiert. Fast alle luminalen Zellen sind CD34⁺, wobei zentral eine schwache Färbung vorherrscht. Flk-1 wird wiederum vermehrt von zentralen Zellen exprimiert, ebenso c-kit. In der Doppelfärbung mit CD34 zeigt sich, dass die peripheren Zellen nur CD34⁺, die zentralen jedoch CD34⁺c-kit⁺ sind. ABCG-2 weist dieselbe Verteilung wie CD34 auf; in der Doppelfärbung zeigt sich, dass die meisten luminalen Zellen CD34⁺ABCG-2⁺ sind. Ferner sind einige glatte Muskelzellen der Media positiv für ABCG-2. Außerdem lassen sich luminal CD133⁺ Zellen nachweisen, Sca-1-Expression hingegen nicht. Ki67 wird als Proliferationsmarker von einigen luminalen Zellen exprimiert, vor allem von zentral gelegenen Zellen. Bei der Doppelfärbung mit CD34 zeigt sich, dass

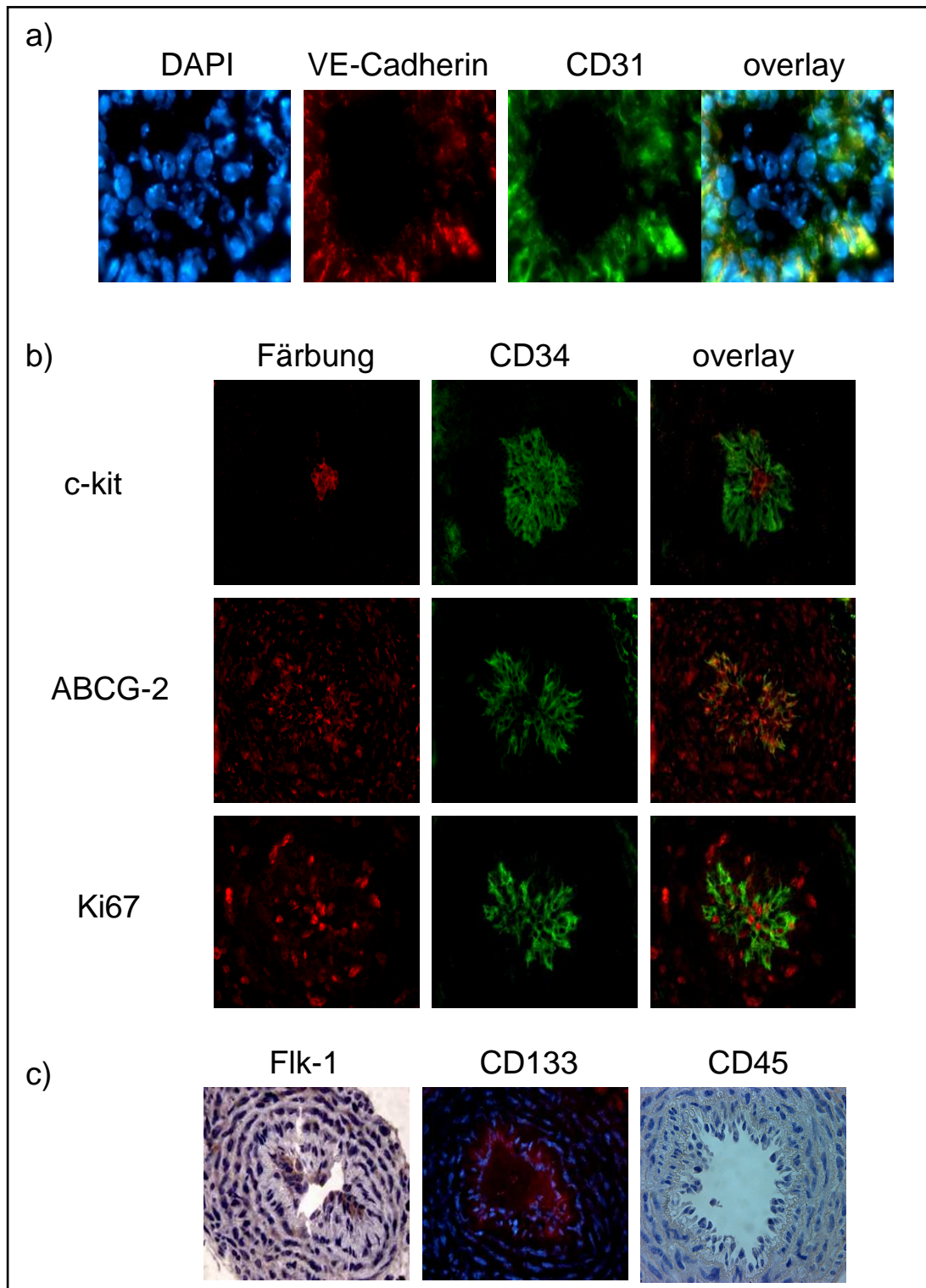


Abbildung 16: Charakterisierung der luminalen Zellen im DA eine Stunde postnatal
a) In der VE-Cadherin/CD31 Doppelfärbung lassen sich luminal periphere CD31⁺VE-Cadherin⁺ Endothelzellen und zentrale Blasten ähnliche CD31⁻VE-Cadherin⁻ Zellen nachweisen. **b)** In der Doppelfärbung mit CD34 können die zentralen Zellen als CD34⁺c-kit⁺ABCG2⁺KI67⁺ charakterisiert werden. **c)** Weiter sind Flk-1 und CD133 luminal nachweisbar, wobei vor allem die zentralen Zellen Flk-1⁺ sind. CD45⁺ Zellen dagegen sind nur vereinzelt identifizierbar.

diese Zellen CD34⁺Ki67⁺ sind. Auch sind vereinzelt Zellen der Gefäßwand positiv für Ki67. Damit kann man im Lumen des Ductus arteriosus anscheinend zwei Zellpopulationen abgrenzen: die Zellen in der Peripherie des Lumens können als CD31⁺, VE-Cadherin⁺, CD34⁺, ABCG-2⁺, die zentralen Zellen als CD34⁺, Sca-1⁻, c-kit⁺, flk-1⁺, ABCG-2⁺, Ki67⁺ charakterisiert werden.

Nach zwölf Stunden ist die VE-Cadherin Expression vor allem am Rand des Lumens zu finden, während CD31 und CD34 von fast allen luminalen Zellen exprimiert werden (siehe Abb. 18). Zu einer starken Abnahme kommt es bei ABCG-2, CD133, flk-1 und c-kit, bei letzterem sind fast keine positiven Zellen mehr sichtbar. Nach wie vor sind nur sehr vereinzelt CD45⁺ und keine Sca-1⁺ oder sm-Aktin⁺ Zellen im Lumen zu finden. Die Proliferation ist im Vergleich zum eine Stunde alten Ductus arteriosus vermehrt und nun in allen Bereichen des Lumens zu beobachten. Zwar sind auch einige proliferierende Zellen in der Media der Gefäßwand vorhanden, doch befindet sich der Großteil der Ki67⁺ Zellen im Lumen.

Diese Resultate werden in der rtPCR des durch Laser-Mikrodissektion isolierten Lumens 12 Stunden postnatal größtenteils bestätigt (siehe Tab. 3). Sca-1, CD133 und CD45 können im Lumen nicht nachgewiesen werden. Bei c-kit, ABCG-2 und flk-1 ist das Signal nicht in allen luminalen Proben zu sehen (siehe Abb. 17). Dies deutet auf eine Abnahme der Expression dieser Proteine hin, wie auch die immunhistologischen und fluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigen. Dagegen ist bei CD34 eine Abnahme unwahrscheinlich, da dieses nach zwölf Stunden noch von allen luminalen Zellen exprimiert wird und auch in allen Proben der Laser-Mikrodissektion zu finden ist (Siehe Abb. 18). Die Endothelmarker vWF, VE-Cadherin und CD31 sind nur in den Proben des Lumens, jedoch nicht in Proben der Gefäßwand zu finden, was darauf schließen lässt, dass diese Bereiche durch die Laser-Mikrodissektion selektiv isoliert wurden. Wie zu erwarten, ist die Gefäßwand positiv für sm-Aktin. Dies deutet darauf hin, dass die luminal befindlichen Zellen nicht aus der Gefäßwand stammen, da sie sich in ihrem Expressionsmuster deutlich von den glatten Muskelzellen der Gefäßwand unterscheiden.

| Marker | n | Ductus Lumen | | Ductus Wand | |
|-------------|---|--------------|---------|-------------|---------|
| | | positiv | negativ | positiv | negativ |
| c-kit | 6 | 3 | 3 | 0 | 6 |
| sca-1 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 |
| ABCG-2 | 5 | 1 | 4 | 0 | 5 |
| flk-1 | 5 | 2 | 3 | 0 | 5 |
| CD133 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| CD34 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| CD45 | 5 | 0 | 5 | 1 | 4 |
| vWf | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| VE-Cadherin | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| CD31 | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 |
| α-smactin | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 |

Tabelle 3: rtPCR Ergebnisse der Proben der Laser-Mikrodissektion

Proben des DA zwölf Stunden postnatal, n bedeutet Anzahl der Proben. Es wird zwischen dem Lumen innerhalb der Lamina elastica interna und der Gefäßwand außerhalb der Lamina elastica interna unterschieden.

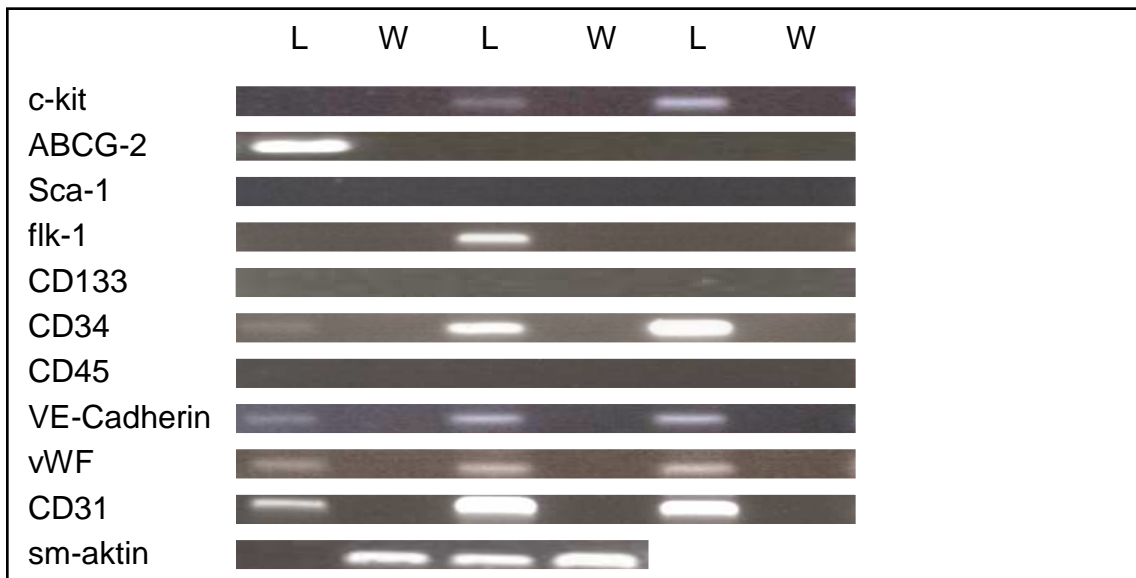


Abbildung 17: Charakterisierung der luminalen Zellen des DA mittels rtPCR

Repräsentative Beispiele der rtPCR der Proben der Laser-Mikrodissektion aus dem DA 12 Stunden postnatal. L sind Proben aus dem Bereich innerhalb der Lamina elastica interna, W aus der Media der Gefäßwand des DA. Die Zellen innerhalb der Lamina elastica interna weisen im Vergleich zur Gefäßwand ein deutlich anderes RNA-Expressionsprofil auf.

Nach 24 Stunden ist keine positive Färbung mehr für CD133, c-kit, flk-1 und ABCG-2 nachzuweisen (siehe Abb. 18). Weiter lassen sich keine Sca-1⁺ und CD45⁺ identifizieren. Für VE-Cadherin ist die Färbung 24 Stunden postnatal nur noch sehr schwach und vor allem im Randbereich des Lumens vorhanden. Dagegen werden CD31 und CD34 korrespondierend von allen Zellen des Lumens exprimiert. Bei der Doppelfärbung von CD31 und sm-Aktin ist zu sehen, dass in der Peripherie vereinzelt CD31⁻sm-Aktin⁺ Zellen zu finden sind.

Die Proliferation ist nun auf einige Zellen im Lumen beschränkt, in der Gefäßwand sind keine Ki67⁺ Zellen mehr zu beobachten.

Zusammenfassend lassen sich anhand von Morphologie und Oberflächenmarkern im Lumen des postnatalen Ductus arteriosus zwei Zellpopulationen nachweisen: In der Peripherie finden sich CD31⁺VE-Cadherin⁺ Endothelzellen mit einem durch CD34, ABCG-2 und CD133 Expression ungewöhnlichen Phänotyp, die morphologisch kleine zirkulär angeordnete Zellkerne aufweisen (siehe Tab. 4). Zentral sind CD31⁻VE-Cadherin⁻ Zellen mit Charakteristika von Progenitorzellen detektierbar, die dort stark proliferieren und durch ihren großen Zellkern eine Blasten ähnliche Morphologie erkennen lassen. Die Charakteristika letzterer Zellpopulation verschwinden über die Zeit, was vermutlich auf Apoptose oder Differenzierung zurückzuführen ist. Auch ist Proliferation vor allem in den ersten zwölf Stunden nachzuweisen; nach 24 Stunden hat sie merklich abgenommen und tritt zu allen Zeitpunkten vermehrt im Lumen des Ductus arteriosus zu auf. Dort sind nach 24 Stunden sm-Aktin positive Zellen vorzufinden, was auf eine Differenzierung in glatte Muskelzellen oder eine Migration glatter Muskelzellen aus der Media hindeuten könnte.

| | DA 1h | | DA 12h | | DA 24h | |
|-------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | zentral | peripher | zentral | peripher | zentral | peripher |
| CD31 | neg | pos | pos | pos | pos | pos |
| VE-Cadherin | neg | pos | neg | pos | neg | pos |
| CD34 | pos | pos | pos | pos | pos | pos |
| c-kit | pos | neg | pos | neg | neg | neg |
| flk-1 | pos | neg | pos | neg | neg | neg |
| ABCG-2 | pos | pos | neg | neg | neg | neg |
| CD133 | pos | pos | neg | neg | neg | neg |
| Sca-1 | neg | neg | neg | neg | neg | neg |
| CD45 | pos | neg | pos | neg | neg | neg |
| sm-actin | neg | neg | neg | neg | neg | pos |
| Ki67 | pos | pos | pos | pos | pos | neg |

Tabelle 4: Immunhistologischer Nachweis der Expression von Oberflächenmarker

Darstellung der Ergebnisse über den Zeitverlauf, wobei zwischen zentral und peripher gelegenen Zellen im Lumen des Ductus arteriosus unterschieden wird. Ist eine Zelle oder mehr angefärbt, wird dies als positiv gewertet (pos), sind keine Zellen im Lumen nachweisbar, wird dies als negativ bewertet (neg).

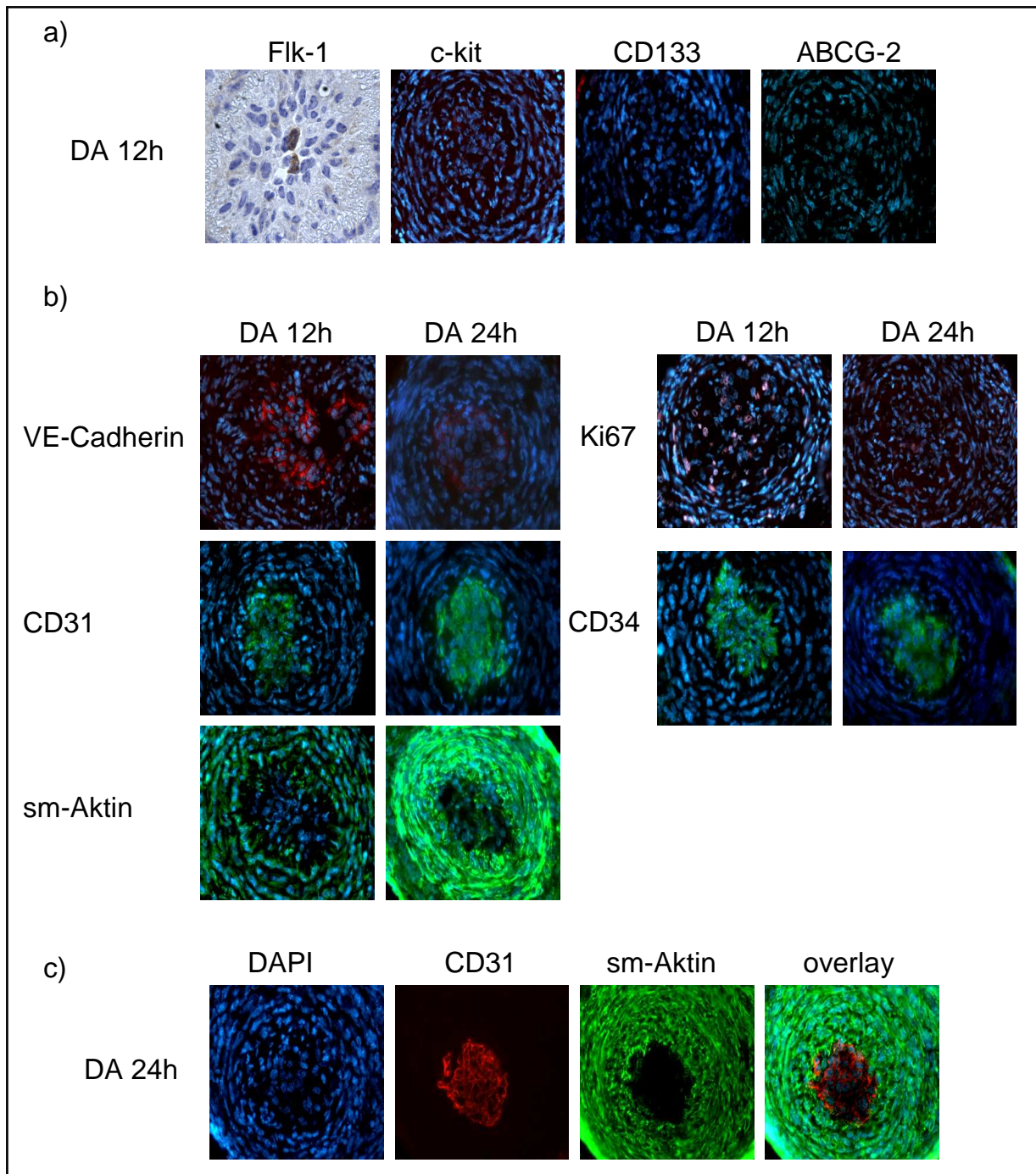


Abbildung 18: Entwicklung der Expression der Oberflächenmarker im DA

a) Bei den zentralen Zellen sind Flk-1, c-kit, CD133 und ABCG-2 nach zwölf Stunden nur noch vereinzelt darstellbar **b)** Im Zeitverlauf sind alle luminalen Zellen CD31⁺CD34⁺, VE-Cadherin ist peripher nur noch nachweisbar. Die Ki67-Expression nimmt deutlich ab, nach 24 Stunden ist eine leichte Expression von sm-Aktin im Lumen nachweisbar **c)** In der CD31/sm-Aktin Doppelfärbung sind im peripheren Bereich des Lumens vereinzelt sm-Aktin⁺CD31⁻ Zellen zu identifizieren.

6 Diskussion

Der Verschluss des Ductus arteriosus ist ein komplexer Prozess, der einer Vielzahl physiologischer Regelungsmechanismen unterliegt. Der prompt Ablauf ist essentiell für die postnatale Kreislaufadaptation Neugeborener und führt innerhalb weniger Stunden zur vollständigen Obliteration eines zuvor großlumigen Gefäßes (Clyman 2006). Da Thrombozyten beim pathologischen arteriellen Gefäßverschluss eine essentielle Rolle spielen, liegt die Vermutung nahe, dass sie auch an diesem physiologischen Gefäßverschluss beteiligt sind. Störungen des Verschlusses des Ductus arteriosus sind trotz effektiver Behandlungsmöglichkeit mit einer beträchtlichen Morbidität und Mortalität assoziiert (Schneider 2006). Durch die steigenden Überlebensraten frühgeborener Kinder wächst die Inzidenz des persistierenden Ductus arteriosus (Hoffman 2002). Daher ist es von zunehmender Bedeutung die Pathogenese des PDA im Detail zu klären, um neue Möglichkeiten für Prävention und Therapie zu identifizieren. Hierfür ist allerdings eine genaue Kenntnis der zellulären Abläufe beim postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus zwingend erforderlich und mit der vorliegenden Arbeit soll dazu ein Beitrag geleistet werden. Darüber hinaus stellt der postnatale Verschluss des Ductus arteriosus ein einzigartiges Modell für die Beobachtung der Abläufe des physiologischen Gefäßverschlusses dar. Denn hierbei kommt es zu einem definierten Zeitpunkt zur Obliteration eines Gefäßes, das zuvor mehr als die Hälfte des biventrikulären kardialen Schlagvolumens an der unbelüfteten Lunge vorbei direkt in die Aorta geleitet hat. Der Ablauf des Gefäßverschlusses kann ohne artifizielle Eingriffe studiert werden und stellt damit ein interessantes neues Modell dar, anhand dessen die Interaktion von Thrombozyten und Endothel näher untersucht werden kann.

Zum postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus trägt neben der Vasokonstriktion auch das intimale Remodelling des obliterierten Lumens bei. Letzterem kommt beim permanenten Verschluss des Ductus arteriosus eine Schlüsselrolle zu; die zellulären Abläufe sind allerdings bislang weitgehend unbekannt (de Reeder 1988)(de Reeder 1990a)(Gittenberger-De Groot 1985)(Silver 1981)(Slomp 1992)(Tannenbaum 1996)(Yoder 1978). Für das pathologische arterielle Gefäßremodelling ist bereits gezeigt worden, dass Thrombozyten hierbei eine wichtige Rolle spielen (Gawaz 2008)(Massberg 2005)(Massberg 2006). Daher stehen die zellulären Vorgänge im Rahmen des luminalen Remodellings beim postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus sowie der Einfluss der Thrombozyten auf diesen Prozess in der vorliegenden Arbeit im Zentrum der Untersuchung.

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 Versuchstiere

Der Verschluss des Ductus arteriosus kann nur bei Neugeborenen untersucht werden, bei denen die postnatale Kreislaufadaptation in physiologischer Weise abläuft. Bei der Maus kommt es dabei zu den gleichen morphologischen Veränderungen wie beim Menschen, jedoch mit schnellerem Ablauf des Prozesses (Tada 1985). Wie Tada et al. darstellen, ist der funktionelle Verschluss bei der Maus innerhalb von drei Stunden abgeschlossen. Der anatomische Verschluss wird in den darauf folgenden Stunden induziert, was durch die Bildung von Myofilamenten in intimalen Zellen belegt wird (Clyman 1999)(Tada 1990). Entsprechend werden in der vorliegenden Versuchsplanung die Zeitpunkte für die Entnahme des Ductus arteriosus gewählt. Nach einer Stunde post partum kann der durch Vasokonstriktion vermittelte funktionelle Verschluss beobachtet werden, der in den folgenden zwölf Stunden in einen dauerhaften anatomischen Verschluss mündet. Beim letzten Beobachtungszeitpunkt nach 24 Stunden sind die Prozesse des Remodellings während des anatomischen Verschlusses bereits weit fortgeschritten.

Die Maus bietet als Versuchstier mehrere Vorteile: durch ihre schnelle Reproduktionsphase und hohe Wurfrate ist eine schnelle Verfügbarkeit des Untersuchungsmaterials in ausreichender Anzahl gewährleistet. Vor allem aber bietet sie die Möglichkeit der genetischen Manipulation, wodurch die Bedeutung einzelner Faktoren für biologische Abläufe genauer analysiert werden kann. Der Verschluss des Ductus arteriosus läuft bei allen Landlebewesen die über eine Lunge verfügen im wesentlichen gleich ab, es ergeben sich allerdings Unterschiede in der Zeitdauer bis zur kompletten Obliteration des Lumens (Bergwerff 1999). Wegen des kleineren Durchmessers des Ductus arteriosus verfügen kleine Tiere wie die Maus nicht über Vasa vasorum (Wolinsky 1967). Auch sind die zirkulierenden Zellen in der neonaten Maus nur schlecht charakterisiert.

Um die Rolle von Thrombozyten beim Verschluss des Ductus arteriosus näher zu untersuchen werden Mausmodelle verwendet, die eine spezifische Gendefizienz aufweisen oder bei denen spezifische Rezeptoren durch monoklonale Antikörper blockiert werden. So weist das NF-E2 Modell eine Defizienz des Transkriptionsfaktors NF-E2 auf, was zu einer Störung der Megakaryopoese führt. Hierdurch wird eine Thrombozytopenie erzeugt, bei der es durch die gestörte Thrombozytenbildung zur Abwesenheit funktionstüchtiger Thrombozyten im peripheren Blut kommt, was eine Blutungsneigung und fehlende arterielle Thrombenbildung hervorruft (Chorne 2007)(Levin 1999). Beim GPIIb knock out Modell führt die Defizienz des Glykoproteins IIB/IIIa auf Thrombozyten und hämatopoietischen Vorläuferzellen zum

Phänotyp der Glanzmann Thrombasthenie (Emambokus 2003). Diese Mäuse sind durch eine fehlende Thrombozytenaggregation, eine stark verlängerte Blutungszeit und eine abnormale Thrombusretraktion charakterisiert, bei normaler Thrombozytenzahl und –morphologie (Nair 2002). Frühere Studien der Arbeitsgruppe konnten in diesem Mausmodell zeigen, dass der GPIIb/IIIa Rezeptor essentieller Vermittler der festen Thrombozytenadhäsion an exponierte extrazelluläre Matrix und dysfunktionales Endothel ist (Massberg 2005). Durch die Behandlung der neonaten Tiere mit einem GPVI-Antikörper wird die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten sowie die hierdurch ausgelöste Thrombusbildung bei arterieller Gefäßverletzung *in vivo* stark beeinträchtigt (Massberg 2003). Weiterhin wird durch einen monoklonalen SDF-1 α -Antikörper eine Blockade der SDF-1/CXCR4-Achse erzielt, die unter anderem eine wichtige Rolle bei der Thrombozyten vermittelten Rekrutierung hämatopoietischer Progenitorzellen zu Gefäßläsionen spielt (Massberg 2006). Durch den Vergleich dieser Modelle mit Wildtyp-Kontrollen oder Isotyp-Antikörper behandelten Wildtyp-Mäusen kann auf die jeweilige Rolle dieser Thrombozytenfaktoren geschlossen werden.

6.1.2 Histologie

Beim Verschluss des Ductus arteriosus kommt es zu histologisch fassbaren Veränderungen in der Gefäßwand und im Lumen. Zu beobachten ist die Vasokonstriktion mit Verdickung der Gefäßwand, die Zunahme der luminalen Zellzahl sowie das intimale Remodelling über den Zeitraum von 24 Stunden. Durch die Hämatoxylin-Eosin Färbung lässt sich die Morphologie im Verlauf des Verschlusses des Ductus arteriosus auf zellulärer Ebene verfolgen. So kann auch der Einfluss der beeinträchtigten Thrombozytenfunktion auf Vasokonstriktion, Obliteration des Lumens und intimale Zellzahl beurteilt werden. Da die Lamina elastica interna in dieser Färbung gut identifizierbar ist, kann die Fläche innerhalb dieser mit hinreichender Genauigkeit histomorphometrisch abgegrenzt werden. Durch die Anfärbung der Zellkerne kann ferner die luminalen Zellzahl quantifiziert werden. Da der Verschluss des Ductus arteriosus über die Länge nicht gleichmäßig, sondern sanduhrförmig verläuft, werden ab dem Anfang des Gefäßes drei Bereiche in definiertem Abstand ausgewählt, um hier eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Gefäße zu gewährleisten.

6.1.3 Immunhistologie und Immunfluoreszenz

Um die molekularen Veränderungen beim Verschluss des Ductus arteriosus mit den morphologischen Beobachtungen zu korrelieren werden Immunhistologie und Immunfluoreszenz eingesetzt. Da Thrombusbildung und Neointimaentstehung auf das Lumen beschränkt sind, ist es wichtig die molekularen Veränderungen nicht nur detektieren, sondern auch lokalisieren zu können. Hierfür sind Immunhistologie und Immunfluoreszenz bestens geeignet, da sie im Gegensatz zu Techniken wie Western-Blot auch eine Lokalisierung der Zellen ermöglichen. Dadurch können wichtige Substrate der Thrombusbildung wie Thrombozyten, Fibrinogen, vWF und Kollagen nachgewiesen werden. Für die Charakterisierung der neointimalen Zellen bietet sich diese Technik ebenfalls an, da sie durch Doppelfärbungen auch eine genauere Zuordnung zu bestimmten Linien und deren Proliferationsverhalten zulässt. Damit können Endothelzellen, glatte Muskelzellen sowie Vorläuferzellen anhand der Expression charakteristischer Marker identifiziert und lokalisiert werden. Weiterhin wird auch die Beteiligung von Signalstoffen wie SDF-1 α beim Verschluss des Ductus arteriosus durch diese Technik untersucht. Durch den Einsatz eines Antikörpers gegen Ki67 kann das Proliferationsverhalten im Ductus arteriosus im Zeitverlauf untersucht und mit dem GPIIb knock out Modell verglichen werden. Das nukleäre Antigen Ki67 wird in allen Phasen des Zellzyklus außer der frühen G1- und G0-Phase exprimiert. In letzterer befinden sich die Zellen im Ruhestadium, sodass Ki67 nur in proliferierenden Zellen detektiert werden kann (Gerdes 1984).

6.1.4 Laser-Mikrodissektion und PCR

Da die PCR eine sehr sensitive Methode ist, um die Expression bestimmter Gene zu analysieren, wurde sie zur Bestätigung der immunhistologischen Befunde eingesetzt. Weil bei einer Analyse des ganzen Ductus arteriosus eine Lokalisierung nicht möglich ist, wird die Mikroskop-gestützte Laser-Mikrodissektion durchgeführt. Dadurch können bestimmte Gewebeareale in histologischen Schnitten isoliert und diese dann mittels rtPCR untersucht werden. Im Falle des Ductus arteriosus wurde das Lumen innerhalb der Lamina elastica interna und ein Bereich der Media isoliert. Durch die Cresyl-Violett Färbung von Gefrierschnitten können Zellen und Morphologie mit ausreichender Genauigkeit beurteilt werden, ohne dass durch diese Färbung die RNA-Moleküle signifikant degradiert werden. Damit kann die Genexpression in den oben genannten Regionen getrennt untersucht werden. Die Selektivität dieser Methode wird dadurch bewiesen, dass nur in Proben aus dem Lumen endotheliale Faktoren wie VE-Cadherin, CD31 und vWF nachzuweisen sind, während sie in

der Gefäßwand fehlen. Allerdings ergeben sich durch die Anfertigung der Gefrierschnitte und die Isolierung der einzelnen Gewebebereiche möglicherweise Beeinträchtigungen der RNA, sodass Transkripte, die nur in geringer Kopienzahl vorliegen, nicht mehr detektiert werden können.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Faktoren und Verlauf der Thrombusbildung beim postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus

Zunächst wird der Frage nachgegangen, ob und wie Thrombozyten zum Verschluss des Ductus arteriosus beitragen. Um zu klären, ob Thrombozyten im Ductus arteriosus überhaupt zu detektieren sind, wird mittels Immunhistologie und Immunfluoreszenz gegen CD41 gefärbt. Dabei zeigen sich bereits eine Stunde postnatal Thrombozyten im Lumen, die im Zentrum einen okkludierenden Thrombus bilden. Dagegen sind pränatal noch keine Thrombozyten zu sehen. Somit kann hier gezeigt werden, dass Thrombozyten bei der Maus im Lumen des Ductus arteriosus vorzufinden sind.

Als nächstes wird untersucht, welche Faktoren für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten verantwortlich sind. Als wichtige Substrate dieser Prozesse können vWF und Fibrin/Fibrinogen identifiziert werden, die dem Endothel aufgelagert sind. Die Exposition dieser Proteine weist darauf hin, dass es zur endothelialen Dysfunktion kommt, was die Thrombozytenadhäsion begünstigt (Frenette 1995)(Massberg 2005). An der initialen Adhäsion von Thrombozyten ist vWF durch die Interaktion mit dem GPIIb-IIIa Komplex entscheidend beteiligt. Hierdurch wird die Interaktion weiterer Rezeptoren mit Liganden der thrombogenen Oberfläche ermöglicht (Savage 1996)(Savage 1998). Als Quellen für vWF kommen hier sowohl Endothelzellen als auch Thrombozyten in Betracht. Als Bindungspartner für vWF kann Kollagen Typ I identifiziert werden, das einen der wichtigsten Liganden für vWF darstellt (Sixma 1995).

Weiterhin kommt bei Gefäßverletzungen der Störung der Endothelintegrität mit nachfolgender Exposition subendothelialer Matrix eine Schlüsselrolle für die Thrombozyten Adhäsion zu (Kasirer-Friede 2007)(Ruggeri 2007). Schon morphologisch kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit und von anderen Autoren (Tada 1990) beobachtet werden, dass sich luminale Endothelzellen eine Stunde postnatal bei zunehmender Konstriktion des Ductus arteriosus von der Lamina elastica interna ablösen und eine Exposition extrazellulärer Matrix verursachen. Zu diesem Zeitpunkt kommt es im Ductus arteriosus zur Exposition von

subendotheliales Kollagen Typ I, dessen Interaktion mit thrombozytärem GPVI das initiale Tethering der Thrombozyten an der Gefäßwand vermittelt (Massberg 2003). Somit ist im Ductus arteriosus eine stark thrombogene Oberfläche vorhanden, die die Thrombozyten Adhäsion induziert. Außerdem sind im Ductus arteriosus wichtige Substrate der arteriellen Thrombusbildung zu finden. Auch beim menschlichen Neugeborenen ist eine Störung der Endothelintegrität sowie Apoptose von Endothelzellen zu beobachten (Silver 1981)(Slomp 1997). So deutet die postnatal gesteigerte Expression von VEGF, E-Selektin und VCAM-1 beim Pavian auf eine endotheliale Dysfunktion hin (Clyman 2002b)(Waleh 2005). Es ist davon auszugehen, dass die postnatale Aktivierung der Endothelzellen im Ductus arteriosus durch die postnatale Vasokonstriktion und konsekutive ischämische Hypoxie der Gefäßwand hervorgerufen wird (Clyman 1999)(Seidner 2001).

Neben der Thrombozytenadhäsion ist auch die Thrombozytenaggregation ein wichtiger Mechanismus, um die stabile Thrombusbildung zu gewährleisten. Die Thrombozyten Aktivierung dient dabei der Verstärkung der prokoagulatorischen Eigenschaften der Thrombozyten, was lokale begrenzte Aggregation und Thrombusbildung zur Folge hat. Von der Vielzahl der Thrombozyten aktivierenden Substanzen können durch vWF und Kollagen zwei wichtige Vertreter nachgewiesen werden. Eine Schlüsselfunktion kommt auf kollagenhaltigen Oberflächen, wie dies beim Ductus arteriosus der Fall ist, dem Kollagenrezeptor GPVI zu, dessen Hauptfunktion die Vermittlung von Adhäsion und Aktivierung ist (Nieswandt 2003). Ebenso führt die Thrombozytenaktivierung durch die Affinitätsmodulation bei Integrinen wie $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ zur Stabilisierung der Adhäsion und Aggregation (Kulkarni 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Freisetzung vasokonstriktorischer Substanzen wie TxA_2 und Serotonin als Reaktion auf die Thrombozytenaktivierung. Thromboxan-Rezeptoren werden im Ductus arteriosus exprimiert, die Bindung von Agonisten führt zudem zu einer starken Vasokonstriktion (Smith 1995). Zwar kann in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss der Thrombozyten auf die Vasokonstriktion mit den verwendeten Methoden nicht zweifelsfrei bewiesen werden, doch lassen die oben dargestellten Ergebnisse dies vermuten.

Durch die Aktivierung der Thrombozyten wird die Voraussetzung für die nachfolgende Thrombozytenaggregation geschaffen. Hierfür ist unter arteriellen Flussbedingungen die Interaktion der Thrombozyten mit Fibrin/Fibrinogen und vWF über GPIIb/IIIa essentiell. Durch die Interaktion von GPIIb/IIIa mit diesen Liganden, kommt es durch Brückenbildung zur Rekrutierung zirkulierender Thrombozyten zum wachsenden Thrombus sowie zur Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion (Ruggeri 1999). Alle diese Faktoren können bereits

eine Stunde postnatal nachgewiesen werden. GPIIb/IIIa vermittelt allerdings auch die Thrombozytenadhäsion an dysfunktionales intaktes Endothel, wodurch es zu einer Entzündungsreaktion kommt, die wiederum die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen zur Folge hat (Massberg 2005). Weiterhin führt das outside-in signaling über GPIIb/IIIa zur Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion und Verstärkung ihrer prokoagulatorischen Aktivität (Ruggeri 1997a).

Das Fehlen von Thrombozytenadhäsion und -aggregation vor der Geburt verdeutlicht, dass erst im Rahmen der postnatalen Kreislaufumstellung die Voraussetzungen für die Thrombusbildung geschaffen werden. Im fetalen Ductus arteriosus werden antithrombozytär wirksame Substanzen wie PGI₂ und NO produziert, wobei von letzterem bekannt ist, dass es einen wichtigen Faktor für die Aufrechterhaltung der Durchgängigkeit des Gefäßes im frühen Gestationsalter darstellt (Coceani 1978)(Momma 1999). Die postnatale Gefäßkontraktion führt zu Mediahypoxie und damit zur Beeinträchtigung der lokalen NO- und Prostaglandinproduktion (Kajino 2000). Dies ist wiederum assoziiert mit dem dauerhaften Verschluss des Ductus arteriosus (Kajino 2000). Doch der lokale Verlust an NO und PGI₂ könnte nicht nur die Vasokonstriktion des Ductus arteriosus induzieren, sondern durch den abrupten Wegfall dieser potenten Inhibitoren der Thrombozytenfunktion auch die Thrombusbildung im Lumen begünstigen.

Damit kann in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass sowohl Thrombozyten als auch wichtige Substrate für Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation bereits zu einem frühen Zeitpunkt im Lumen des Ductus arteriosus zu finden sind. Die Interaktion der Thrombozyten mit der stark thrombogenen Oberfläche des Ductus arteriosus führt zur Bildung okkludierender Thromben. Auch beim Menschen kann in wenigen Einzelbeobachtungen eine Thrombusbildung im Ductus arteriosus nachgewiesen werden. Hier kommt es innerhalb von 16 Stunden zur Ausbildung freier, muraler oder okkludierender Thromben. (Silver 1981). Weiterhin kann eine Organisation des Thrombus beobachtet werden, die zu einer Umwandlung in fibröses Gewebe führt (Gittenberger-De Groot 1977)(Silver 1981).

Um zu untersuchen, ob die Thrombusbildung im Ductus arteriosus funktionelle Relevanz für den postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus hat, wird bei GPIIb^{-/-}, NF-E2^{-/-} und anti-GPVI behandelten Tieren die Durchgängigkeit des Ductus arteriosus mittels Angiographie ermittelt. Hier zeigt sich, dass der Verlust von Thrombozyten sowie die Beeinträchtigung von Thrombozytenadhäsion oder -aggregation die Verschlussrate des Ductus arteriosus signifikant vermindert. Verschiedene Mechanismen können in Betracht gezogen werden, die den

beobachteten Thrombozyten vermittelten Effekt beim postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus induzieren. So kann vermutet werden, dass akkumulierte Thrombozyten vasoaktive Substanzen wie Thromboxan A₂ oder Serotonin freisetzen und auf diese Weise die Vasokonstriktion unterstützen. Weiterhin kann in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass okkludierende Thromben das Restlumen des konstringierten Ductus arteriosus obliterieren. Darüber hinaus scheinen Thrombozyten die Akkumulation myeloider Zellen im Lumen des Ductus arteriosus zu triggern und auf diese Weise das Remodelling maßgeblich zu beeinflussen, worauf im Weiteren näher eingegangen wird.

Im Verlauf des Verschlusses kommt es bei der Maus zur Einwanderung von Zellen in diesen Thrombus, wobei nur sehr wenige Leukozyten zu finden sind; dies lässt eine Entzündungsreaktion unwahrscheinlich erscheinen. Bis auf den durch Endothelzellen exprimierten vWF kommt es im Zeitverlauf zu einer Abnahme von CD41 und Fibrinogen, was auf einen Abbau im Rahmen der Thrombusorganisation schließen lässt.

6.2.2 Einfluss von Thrombozyten auf Verschluss und Remodelling des Ductus arteriosus

Nach dem funktionellen Verschluss kommt es durch ausgeprägtes luminales Remodelling zum permanenten, anatomischen Verschluss des Ductus arteriosus (Clyman 2006). Diese Prozesse werden von zahlreichen Autoren als Neointimabildung bezeichnet (de Reeder 1988)(de Reeder 1990a)(Gittenberger-De Groot 1985)(Silver 1981)(Slomp 1992)(Tannenbaum 1996)(Yoder 1978). Die Ausbildung einer Neointima im pathologischen Sinne wird als Anpassungsprozess arterieller Gefäße an eine Vielzahl schädigender Einflüsse wie chronische Entzündung, pulmonale Hypertonie oder mechanische Schädigung gesehen (Schwartz 1995).

Wie sich bei der mit GPVI-Antikörper behandelten Gruppe zeigt, ist bei der Mehrzahl die vollständige Obliteration des luminalen Flusses zwölf Stunden post partum ausgeblieben, obwohl diese in der Maus normalerweise nach drei bis vier Stunden erfolgt. Wesentlich deutlicher ist dies bei den NF-E2^{-/-} Tieren zu sehen, bei denen das Lumen zu diesem Zeitpunkt noch weit offen ist. Wie bei Mäusen ist beim humanen Frühgeborenen die Entwicklung einer Hypoxie der Media abhängig von der Obliteration des luminalen Flusses, da die Gefäßwand nicht über Vasa vasorum verfügt und so ihre Sauerstoffversorgung ausschließlich vom luminalen Fluss abhängt (Narayanan 2000)(Wolinsky 1967). Die Mediahypoxie gilt wiederum als entscheidender Faktor für die Induktion des anatomischen Remodellings (Clyman 1999). Da die Obliteration des Lumens bei Beeinträchtigung der

Thrombozytenfunktion ausbleibt, kann sich auch die Mediahypoxie nicht voll ausbilden, die als Voraussetzung für das anatomische Remodelling angesehen wird.

Als erster Schritt der pathologischen Neointimabildung gilt die Thrombusbildung (Clowes 1983b). Wie oben gezeigt werden kann, ist dies auch beim Ductus arteriosus der Fall. Aktivierte Thrombozyten sezernieren eine Reihe proinflammatorischer Substanzen, wie etwa TGF-beta und PDGF, die die Akkumulation extrazellulärer Matrix sowie die Migration glatter Muskelzellen stimulieren und somit einen wichtigen Einfluss auf das Remodelling des Ductus arteriosus haben (Tannenbaum 1996). Eine vermehrte Produktion dieser beiden Faktoren kann auch bei der In-Stent-Restenose beobachtet werden (Ward 2000). PDGF beispielsweise gilt als ein Mitogen für viele unterschiedliche Zellpopulationen, unter anderem auch glatte Muskelzellen und Endothelzellen (Beitz 1991)(Ferns 1991). Eine Inhibition von PDGF führt nach experimenteller arterieller Gefäßverletzung zu einer Verminderung der Neointimabildung (Ferns 1991). Da hierbei Thrombozyten eine wichtige Quelle für PDGF sind, liegt nahe dass auch eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion die Neointimaformation beeinflusst. So kann gezeigt werden, dass Thrombozytopenie die Ausbildung der Intimahyperplasie nach Gefäßverletzung vermindert (Fingerle 1989). Zudem sezernieren Thrombozyten weitere Mitogene Substanzen wie TxA2 und Serotonin (Pakala 1997). Da im Ductus arteriosus Thrombozyten zu finden sind, ist ein Einfluss auf wichtige Prozesse der Neointimabildung wahrscheinlich.

Insofern ist es nicht verwunderlich, dass bei Thrombozyten-Defizienz (NF-E2^{-/-} Mäuse) oder Blockade der Thrombozytenadhäsion eine Verminderung der intimalen Zellzahl induziert wird. So kann in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Zahl kernhaltiger Zellen innerhalb der Lamina elastica interna bei diesen Tieren deutlich reduziert ist. Darüber hinaus fällt bei GPIIb^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion von Ki67⁺, also proliferierender Zellen auf. Da GPIIb der wichtigste Rezeptor für die Thrombozytenaggregation ist, erscheint das Ausbleiben der Thrombusbildung im Ductus arteriosus im GPIIb^{-/-} Model sehr wahrscheinlich. Dadurch ist der erste wichtige Schritt der Neointimabildung gestört und die oben genannten mitogenen Substanzen können nicht zur Wirkung kommen, was die verminderte intimale Proliferationsrate im Vergleich zum Wildtyp erklären könnte. Dieser Einfluss der Thrombozyten auf das Proliferationsverhalten neointimaler Zellen könnte auch eine Erklärung darstellen für die Reduzierung der neointimalen Zellzahl bei der GPVI-Antikörper und NF-E2^{-/-} Gruppe. Gerade die Proliferation luminaler Zellen stellt einen wichtigen Bestandteil des intimalen Remodellings und damit des anatomischen Verschlusses des Ductus arteriosus dar (Clyman 1999). Die

erhobenen Daten ergeben also deutliche Indizien, dass im Ductus arteriosus adhärierende Thrombozyten sowohl die Rekrutierung als auch die Proliferation myeloider Zellen maßgeblich beeinflussen.

Aus den beschriebenen Mechanismen der Thrombusbildung im Ductus arteriosus ist ersichtlich, dass eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion für die Obliteration des Lumens nicht folgenlos bleiben dürfte. Von COX-Inhibitoren wie Indomethacin ist bekannt, dass sie bei antenataler und postnataler Gabe zum Verschluss des Ductus arteriosus führen können, obwohl sie einen starken inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion aufweisen (Friedman 1978). Jedoch kann bei Frühgeborenen eine erhöhte Inzidenz des persistierenden Ductus arteriosus nachgewiesen werden, wenn sie kurz vor Geburt aufgrund maternaler Tokolyse Indomethacin ausgesetzt wurden (Hammerman 1998)(Norton 1993). Diese paradoxe Reaktion wird durch eine Veränderung der Kontraktilität erklärt, welche durch eine kompensatorisch erhöhte NO-Produktion und den Verlust glatter Muskelzellen hervorgerufen wird (Clyman 2001). Allerdings könnte auch die Thrombozyteninhibition durch Indomethacin das Ausbleiben eines vollständigen Verschlusses bewirken.

Weiterhin zieht die postnatale Gabe von NO-Donatoren ein verlängertes Persistieren des Ductus arteriosus nach sich (Seidner 2001)(Walsh 1988). Neben der vasodilatatorischen Wirkung von NO ist auch eine inhibitorische Wirkung auf Thrombozyten bekannt, sodass nicht auszuschließen ist, dass auch letzterer Effekt an der Störung des Verschlusses beteiligt ist.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass Thrombozyten das luminale Remodelling des Ductus arteriosus über zahlreiche Mechanismen beeinflussen. Als Korrelat dafür dient die veränderte Morphologie, luminale Zellzahl sowie Proliferationsrate der Tiermodelle mit beeinträchtigter Thrombozytenfunktion.

6.2.3. Beteiligung der SDF-1/CXCR4-Achse am Verschluss des Ductus arteriosus

Da Thrombozyten nicht nur mit lokalen Gefäßzellen interagieren, sondern auch zirkulierende Blutzellen zu Gefäßverletzungen rekrutieren, wird der Einfluss der SDF-1/CXCR4-Achse auf Verschluss und Remodelling des Ductus arteriosus untersucht. Als wichtige erste Quelle von SDF-1 α bei arteriellen Gefäßverletzungen können adhärente Thrombozyten identifiziert werden, die eine Rekrutierung von CXCR4⁺ Zellen vermitteln (Massberg 2006). Für die pathologische Neointimaformation nach Gefäßverletzung kann gezeigt werden, dass nicht nur lokale Zellen durch Proliferation und Migration zur Intimahyperplasie beitragen, sondern auch zirkulierende Zellen, die aus dem Knochenmark stammen, hierbei eine wichtige Rolle

spielen (Asahara 1997)(Sata 2002). Für die Rekrutierung dieser hämatopoietischen Zellen zu arteriellen Gefäßläsionen kommt dem Chemokin SDF-1 α eine entscheidende Rolle zu (Schober 2003)(Zernecke 2005)(Massberg 2006). Dabei sind Thrombozyten die erste Hauptquelle, weil sie innerhalb von Minuten an der Gefäßverletzung adhären und nach Aktivierung SDF-1 α freisetzen (Massberg 2006). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer vermehrten Expression von SDF-1 α durch glatte Muskelzellen der Gefäßwand, die damit die zweite Quelle darstellen und langsamer, aber länger SDF-1 α sezernieren als Thrombozyten (Zernecke 2005).

Im Ductus arteriosus kann ebenfalls SDF-1 α nachgewiesen werden, wobei bereits pränatal eine leichte Expression in der Gefäßwand zu beobachten ist. Parallel zu den Vorgängen bei arterieller Gefäßverletzung können auch hier Thrombozyten als erste wichtige Quelle für SDF-1 α identifiziert werden. In der Gefäßwand ist eine zunehmende SDF-1 α Expression über die ersten zwölf Stunden post partum zu beobachten. Von der Gefäßwand des Ductus arteriosus ist bekannt, dass Sauerstoff- und Nährstoffmangel die Apoptose glatter Muskelzellen auslösen (Levin 2005). Gewebhypoxie wiederum gilt als starker Stimulus der SDF-1 α Expression, wobei dies unter anderem durch HIF-1 vermittelt wird (Ceradini 2004).

Da im Lumen des Ductus arteriosus SDF-1 α Rezeptor CXCR4⁺ Zellen zu finden sind, liegt es Nahe, dass dieses Chemokin beim postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus eine Rolle spielt. Entsprechend zeigt die Blockade der SDF-1/CXCR4-Achse und anschließende angiographische Evaluation eine starke Beeinträchtigung des Verschluss des Ductus arteriosus, wodurch die funktionelle Relevanz von SDF-1 α belegt wird. Damit kann durch diese Studie erstmals nachgewiesen werden, dass die SDF-1/CXCR4-Achse am Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt ist. Die Daten deuten zudem darauf hin, dass durch thrombozytäres SDF-1 α zirkulierende CXCR4⁺ Zellen im Lumen des Ductus arteriosus rekrutiert werden und auf diese Weise den Verschluss des Gefäßes unterstützen.

Zwar kann eine Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen nicht zweifelsfrei belegt werden, doch deutet die Expression von SDF-1 α und dessen zeitlicher Verlauf auf deutliche Parallelen zu beschriebenen Vorgängen im Rahmen arterieller Gefäßverletzungen hin (Massberg 2006). Die beobachtete Reduzierung der neointimalen Zellzahl nach Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion könnte teilweise auf diesen Mangel an thrombozytärem SDF-1 α zurückzuführen sein.

Allerdings ist SDF-1 α nicht nur an der Rekrutierung von Progenitorzellen beteiligt, sondern beeinflusst auch die Migration und Differenzierung von CD34⁺ Progenitorzellen in Endothelzellen (Daub 2006)(Langer 2006)(Stellos 2008). Außerdem ist bekannt, dass

endotheliale Progenitorzellen unter dem Einfluss von Thrombozyten die Expression von c-kit vermindern, sowie vermehrt endotheliale Marker wie PECAM-1 (CD31) exprimieren (Jin 2006). Daher kann spekuliert werden, dass dies eine Erklärung für den Verlust der Progenitorzellmarker wie CD133, c-kit und flk-1 über den Zeitverlauf des Verschlusses darstellen könnte. Andererseits ist auch eine Apoptose dieser Zellpopulation möglich, was das Verschwinden der Marker plausibel macht.

6.2.4 Identifizierung einer Zellpopulation mit Charakteristika von Progenitorzellen im Lumen des Ductus arteriosus

Für den anatomischen Verschluss des Ductus arteriosus wird ähnlich wie bei der Neointimaformation eine Einwanderung lokaler glatter Muskelzellen aus der Media als Ursprung der intimalen Zellen beschrieben. Als zweite neointimale Zellpopulation werden die luminalen Endothelzellen angesehen (Clyman 1999). Diese weisen postnatal einen veränderten Phänotyp auf, der hinsichtlich der Integrinexpression dem wachsender kapillärer Endothelzellen ähnelt (Clyman 1996). In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass im Lumen des Ductus arteriosus eine Stunde postnatal eine weitere luminal Zellpopulation beschrieben werden kann, die sich hinsichtlich ihrer Morphologie und Expression von Oberflächenmarkern deutlich von endothelialen Zellen und glatten Muskelzellen unterscheidet.

Im Lumen des Ductus arteriosus lassen sich zwei Zellpopulationen voneinander abgrenzen. Zum einen die nahe der Lamina elastica interna gelegenen peripheren CD31⁺VE-Cadherin⁺ Endothelzellen, zum anderen die zentral gelegenen Blasten ähnlichen CD31⁻VE-Cadherin⁻ CD45⁻ Zellen. Somit weisen die peripheren Endothelzellen die typischen Endothelmarker VE-Cadherin und CD31 auf, während diese bei den zentralen Zellen nicht zu finden sind. Der Phänotyp der peripheren Endothelzellen ist ungewöhnlich, könnte aber auf die Unreife dieser Zellen im neonaten Organismus hinweisen. Sie können als CD31⁺ VE-Cadherin⁺ CD34⁺ CD133⁺ ABCG-2⁺ charakterisiert werden.

Dagegen zeichnen sich die zentral gelegenen Zellen im Lumen durch Marker aus, wie sie charakteristischerweise auf Progenitorzellen zu finden sind. So können sie als CD34⁺ c-kit⁺ Sca-1⁻ flk-1⁺ CD133⁺ ABCG-2⁺ bezeichnet werden. Hierbei ist vor allem die Expression von c-kit bemerkenswert, da dies ein relativ selektiver Marker für hämatopoietische Progenitorzellen ist. Er ist ein kritischer Faktor bei der Mobilisierung von Knochenmarkzellen und wird im peripheren Blut nur sehr selten gefunden, da er mit zunehmender Differenzierung immer weniger exprimiert wird (Ashman 1999). Zudem weist gerade die Kombination mit

CD34 und CD133 auf zirkulierende, wenig differenzierte Zellen hin. CD133 wird ähnlich wie c-kit vor allem von hämatopoietischen Progenitorzellen im Knochenmark exprimiert und geht bald nach Mobilisierung durch Differenzierung verloren (Majka 2000). Erstaunlicherweise ist CD133 auch auf den Endothelzellen im Ductus arteriosus zu finden, was bisher vor allem für endotheliale Progenitorzellen beschrieben worden ist (Peichev 2000)(Yin 1997). Da auch Endothelzellen Marker wie flk-1, ABCG-2 oder CD34 aufweisen können, ist für die Differenzierung der zentralen Zellen vor allem c-kit entscheidend, da es nur von diesen exprimiert wird und relativ selektiv für Progenitorzellen ist. Zudem ist eine Stunde post partum eine vermehrte Expression des Proliferationsmarkers Ki67 im Zentrum des Lumens zu sehen, was darauf hindeutet dass sich dort Zellen mit großem Proliferationspotential befinden. Von endothelialen Progenitorzellen ist bekannt, dass sie proangiogene Cytokine sezernieren sowie die Migration und Proliferation endothelialer Zellen stimulieren (Gulati 2003)(Gunsilius 2000). Dies könnte auch die postnatale Veränderung der endothelialen Integrinexpression erklären, die zu diesem Zeitpunkt wachsenden kapillären Endothelzellen ähnelt (Clyman 1996).

Entsprechendes zeigen Proben der Laser-Mikrodissektion aus luminalen Abschnitten des Ductus arteriosus, die mittels rtPCR analysiert werden. Zwölf Stunden postnatal kann im Lumen die Expression von CD 34, c-kit, flk-1, ABCG-2 sowie die Endothelmarker CD31, VE-Cadherin und vWF nachgewiesen werden. Dagegen lassen sich in LCM-Proben der Gefäßwand diese Marker nicht nachweisen, was darauf schließen lässt, dass es sich nicht um eine Population aus der Gefäßwand handelt.

Über den Zeitverlauf nimmt die Proliferation in der neu gebildeten Neointima ab und die Progenitorzellmarker CD133, c-kit, flk-1 und ABCG-2 sind nach 24 Stunden nicht mehr detektierbar. Dies ist zwar auch durch den Zelltod dieser Population zu erklären; als wahrscheinlicher erscheint es jedoch, dass diese Zellen differenzieren und ihre proliferative Potenz einbüßen. Nach 24 Stunden sind nur noch CD34⁺CD31⁺ Zellen zu finden sowie eine schwache Färbung für sm-Aktin. Die schwache Expression von Merkmalen glatter Muskelzellen durch luminale Zellen 24 Stunden post partum ist bekannt, ebenso wie die weitere Differenzierung zu typischen glatten Muskelzellen nach mehreren Tagen (Tada 1990). Dies lässt vermuten, dass die Zellen im Lumen im analysierten Zeitraum zu glatten Muskelzellen differenzieren, die wiederum den permanenten Verschluss des Ductus arteriosus ermöglichen.

Zwar kann eine Rekrutierung von Progenitorzellen beim Verschluss des Ductus arteriosus mit den vorliegenden Methoden nicht bewiesen werden, doch weisen zahlreiche Befunde darauf

hin. Denn diese Zellpopulation ist weder pränatal noch in der Gefäßwand nachweisbar, weshalb eine Einwanderung sessiler c-kit⁺ Zellen als unwahrscheinlich einzuschätzen ist. So könnte die Reduzierung der neointimalen Zellzahl nach Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion durch eine Störung der Rekrutierung von Progenitorzellen erklärt werden. Als wichtiger Faktor bei diesem Prozess kommt SDF-1 α in Frage, das von luminalen Thrombozyten freigesetzt wird. Für die Mobilisierung und Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen nach Gewebeschämie werden SDF-1 α und VEGF als wichtige Mediatoren angesehen (Lee 2000)(Pillarsetti 2001)(Yamaguchi 2003). Im Ductus arteriosus werden beide postnatal vermehrt exprimiert, wodurch die Akkumulation zirkulierender Zellen erklärt werden könnte. Über die Herkunft dieser Zellen kann nur spekuliert werden, doch können im humanen Nabelschnurblut Populationen mit ähnlicher Markerexpression gefunden werden (Anderson 1990)(Mayani 1998).

Somit sind in der vorliegenden Arbeit die zellulären Vorgänge während des postnatalen Verschlusses des Ductus arteriosus erstmals näher untersucht worden. Neben Endothelzellen ist interessanterweise eine weitere Zellpopulation zu finden, die weder aus der lokalen Gefäßwand stammt noch pränatal vorzufinden ist. Der Phänotyp dieser Zellen lässt vermuten, dass es sich bei dieser zweiten Population um rekrutierte zirkulierende Progenitorzellen handelt, die durch Proliferation und Differenzierung am Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt sind.

6.3 Ausblick

Für ein genaues Verständnis der Abläufe beim postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus ist eine bessere Kenntnis der zellulären und molekularen Vorgänge von essentieller Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass bei der Maus Thrombozyten am Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt sind und es sehr rasch postnatal zur Thrombusbildung kommt. Von Interesse wäre daher eine Untersuchung der Frage, ob die Thrombusbildung in dieser Weise auch beim Menschen abläuft. Weiterhin könnte die Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion oder Blutgerinnung sowie eine Thrombozytopenie beim menschlichen Neugeborenen einen Risikofaktor bezüglich der Entwicklung eines persistierenden Ductus arteriosus darstellen. Hierzu gibt es bislang in der Literatur keine ausreichenden Untersuchungen. Zudem gilt es, die Bedeutung der Thrombozyten auf die Vasokonstriktion genauer zu analysieren. Auch der Einfluss von COX-Inhibitoren auf Thrombozytenfunktion und Verschluss des Ductus arteriosus bedarf einer genaueren Untersuchung. Daraus könnten sich aufschlussreiche Erkenntnisse bezüglich Prävention und Therapie des persistierenden Ductus arteriosus ergeben, der nach wie vor als ernstzunehmende Komplikation der Frühgeburtlichkeit angesehen werden muss.

7 Zusammenfassung

Für pathologische wie physiologische Hämostase sind Thrombozyten von essentieller Bedeutung. Ihre Rolle bei der Entstehung arterieller Thrombose ist vielfältig belegt, da diesem Prozess durch Myokardinfarkt und Hirninfarkt eine hohe Relevanz zukommt. In der vorliegenden Arbeit wird eine völlig neue Funktion der Thrombozyten gezeigt: Im Rahmen der postnatalen Kreislaufadaptation sind sie am physiologischen Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt. In der fetalen Zirkulation stellt dieser ein großlumiges arterielles Shuntgefäß zwischen Arteria pulmonalis und Aorta dar.

In der vorliegenden Arbeit kann erstmals gezeigt werden, dass Thrombozyten am postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus beteiligt sind. Hierbei wird die luminale Thrombusbildung durch endotheliale Dysfunktion sowie die Störung der Endothelintegrität mit Exposition subendothelialer Matrix ermöglicht. Dadurch sind Substrate für Adhäsion, Aggregation sowie Aktivierung der Thrombozyten gegeben. Die funktionelle Relevanz der Thrombusbildung für den Verschluss des Ductus arteriosus wird durch die Ergebnisse der Angiographie belegt.

Doch sind Thrombozyten nicht nur am initialen Verschluss, sondern auch am nachfolgenden Remodelling des Ductus arteriosus beteiligt. Eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion im GPIIb^{-/-}, NF-E2^{-/-} und anti-GPVI Modell bewirkt eine signifikante Reduktion der luminalen Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp. Weiterhin kommt es zu morphologischen Veränderungen sowie einer verminderten Proliferationsrate, die jeweils auf eine Störung des kompletten Verschlusses schließen lassen. Bei genauerer Untersuchung des luminalen Remodellings zeigt sich überraschenderweise die Beteiligung der SDF-1 α /CXCR4-Achse am postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus. Postnatal sind die schnell adhätierenden Thrombozyten die wichtigste Quelle für SDF-1 α . Später wird SDF-1 α auch in der Gefäßwand vermehrt produziert. Die Analyse der zellulären Zusammensetzung der Intima ergibt ebenfalls unerwartete Resultate. So kann neben den Endothelzellen eine zweite Zellpopulation nachgewiesen werden, die durch die Marker CD34, c-kit, flk-1, CD133 und ABCG-2 Charakteristika von Progenitorzellen aufweist.

Damit können einige Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie Thrombozyten den Verschluss des Ductus arteriosus beeinflussen könnten: 1) Durch die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen kann der funktionelle Verschluss begünstigt werden; 2) die Thrombusbildung führt zur Obliteration des luminalen Flusses und verhindert die Wiedereröffnung; 3) die Freisetzung von SDF-1 α beeinflusst das intimale Remodelling und die Rekrutierung zirkulierender Zellen; 4) Thrombozyten und rekrutierte Progenitorzellen beeinflussen das intimale Remodelling und damit den anatomischen Verschluss.

8 Summary

Platelets are essential for physiologic and pathologic hemostasis. Their essential role in the development of arterial thrombosis is a proven fact, because of the high relevance of this process for the development of myocardial infarction and ischemic stroke. In this thesis, a totally new function of platelets can be shown: they contribute to the physiologic postnatal closure of the ductus arteriosus, which is a shunt vessel between the pulmonary artery and the aorta in the fetal circulation.

We can show here for the first time that platelets contribute to the postnatal closure of the ductus arteriosus. The luminal thrombus formation is facilitated by endothelial dysfunction and disruption of endothelial integrity with subsequent exposition of subendothelial matrix. Hence, substrates for platelet adhesion, activation, and aggregation can be found within the lumen of the ductus arteriosus. The angiographic results further prove the functional relevance of the thrombus formation for the closure of the ductus arteriosus.

However, platelets do not only contribute to initial closure, but also to the subsequent remodelling of the ductus arteriosus. Dysfunctional platelets in GPIIb^{-/-}, NF-E2^{-/-}, and anti-GPVI mice cause a significant reduction of the luminal cell count compared to wild type. Moreover, there are morphological alterations and a reduced proliferation rate, which is indicative of a failure of complete closure. The precise analysis of the luminal remodelling surprisingly shows a contribution of the SDF-1 α /CXCR4 axis in the postnatal closure of the ductus arteriosus. Postnatally, rapidly adhering platelets are the most important source for SDF-1 α . Later, SDF-1 α is also expressed within the vessel wall. The analysis of the cellular composition of the intima reveals unexpected results as well: besides endothelial cells, a second cell population can be identified showing characteristics of progenitor cells by expressing CD34, c-kit, flk-1, CD133 and ABCG-2.

Several possibilities can thus be pointed out regarding the question how platelets could affect the postnatal closure of the ductus arteriosus: 1) by secreting vasoactive mediators, functional closure could be facilitated; 2) by obliterating the luminal flow through thrombus formation and preventing the reopening of the constricted vessel; 3) by secreting SDF-1 α , platelets could affect intimal remodelling and recruitment of circulating cells; 4) platelets and recruited circulating progenitor cells could affect intimal remodelling and anatomic closure.

9 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Abi-Younes, S., Sauty, A., Mach, F., Sukhova, G. K., Libby, P., and Luster, A. D.
The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques.
Circ.Res. 86 (2000) 131-138
- Abrams, C., Deng, Y. J., Steiner, B., O'Toole, T., and Shattil, S. J.
Determinants of specificity of a baculovirus-expressed antibody Fab fragment that binds selectively to the activated form of integrin alpha IIb beta 3.
J.Biol.Chem. 269 (1994) 18781-18788
- Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J. C.
The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood.
J.Exp.Med. 185 (1997) 111-120
- Anderson, D. F., Bissonnette, J. M., Faber, J. J., and Thornburg, K. L.
Central shunt flows and pressures in the mature fetal lamb.
Am.J.Physiol 241 (1981) H60-H66
- Anderson, D. M., Lyman, S. D., Baird, A., Wignall, J. M., Eisenman, J., Rauch, C., March, C. J., Boswell, H. S., Gimpel, S. D., Cosman, D., and .
Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms.
Cell 63 (1990) 235-243
- Andre, P., Denis, C. V., Ware, J., Saffaripour, S., Hynes, R. O., Ruggeri, Z. M., and Wagner, D. D.
Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins.
Blood 96 (2000) 3322-3328
- Andrews, N. C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M. B., Tempst, P., and Orkin, S. H.
Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein.
Nature 362 (1993) 722-728
- Arya, M., Anvari, B., Romo, G. M., Cruz, M. A., Dong, J. F., McIntire, L. V., Moake, J. L., and Lopez, J. A.
Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers.
Blood 99 (2002) 3971-3977
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der, Z. R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M.
Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.
Science 275 (1997) 964-967
- Ashman, L. K.

The biology of stem cell factor and its receptor C-kit.
Int.J.Biochem.Cell Biol. 31 (1999) 1037-1051

Atkinson, B. T., Jarvis, G. E., and Watson, S. P.
Activation of GPVI by collagen is regulated by alpha2beta1 and secondary mediators.
J.Thromb.Haemost. 1 (2003) 1278-1287

Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D. K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T. E., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Witte, L., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F., and Rafii, S.
Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis.
Nat.Med. 10 (2004) 64-71

Baglia, F. A., Badellino, K. O., Li, C. Q., Lopez, J. A., and Walsh, P. N.
Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin.
J.Biol.Chem. 277 (2002) 1662-1668

Bauer, M., Maschberger, P., Quek, L., Briddon, S. J., Dash, D., Weiss, M., Watson, S. P., and Siess, W.
Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin alphaIIb beta3 inside-out signalling during shape change.
Thromb.Haemost. 85 (2001) 331-340

Baumgartner, H. R.
Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium.
Thromb.Haemost. 37 (1977) 1-16

Beitz, J. G., Kim, I. S., Calabresi, P., and Frackelton, A. R., Jr.
Human microvascular endothelial cells express receptors for platelet-derived growth factor.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88 (1991) 2021-2025

Bellucci, S. and Caen, J.
Molecular basis of Glanzmann's Thrombasthenia and current strategies in treatment.
Blood Rev. 16 (2002) 193-202

Bendeck, M. P., Zempo, N., Clowes, A. W., Galardy, R. E., and Reidy, M. A.
Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat.
Circ.Res. 75 (1994) 539-545

Bennett, J. S. and Vilaire, G.
Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine.
J.Clin.Invest 64 (1979) 1393-1401

Bergwerff, M., Deruiter, M. C., and Gittenberger-De Groot, A. C.
Comparative anatomy and ontogeny of the ductus arteriosus, a vascular outsider.
Anat.Embryol.(Berl) 200 (1999) 559-571

Berlanga, O., Bobe, R., Becker, M., Murphy, G., Leduc, M., Bon, C., Barry, F. A., Gibbins, J. M., Garcia, P., Frampton, J., and Watson, S. P.

Expression of the collagen receptor glycoprotein VI during megakaryocyte differentiation.
Blood 96 (2000) 2740-2745

Berndt, M. C., Shen, Y., Dopheide, S. M., Gardiner, E. E., and Andrews, R. K.

The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex.
Thromb.Haemost. 86 (2001) 178-188

Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., and Springer, T. A.

A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1).
J.Exp.Med. 184 (1996) 1101-1109

Bradford, H. N., Dela Cadena, R. A., Kunapuli, S. P., Dong, J. F., Lopez, J. A., and Colman, R. W.

Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib-IX-V complex.
Blood 90 (1997) 1508-1515

Bradford, H. N., Pixley, R. A., and Colman, R. W.

Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation.
J.Biol.Chem. 275 (2000) 22756-22763

Broccoli, F. and Carinci, P.

Histological and histochemical analysis of the obliteration processes of ductus arteriosus Botalli.
Acta Anat.(Basel) 85 (1973) 69-83

Campbell, M.

Natural history of persistent ductus arteriosus.
Br.Heart J. 30 (1968) 4-13

Carter, A. J., Laird, J. R., Farb, A., Kufs, W., Wortham, D. C., and Virmani, R.

Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model.
J.Am.Coll.Cardiol. 24 (1994) 1398-1405

Celikel, R., Ruggeri, Z. M., and Varughese, K. I.

von Willebrand factor conformation and adhesive function is modulated by an internalized water molecule.
Nat.Struct.Biol. 7 (2000) 881-884

Celletti, F. L., Waugh, J. M., Amabile, P. G., Brendolan, A., Hilfiker, P. R., and Dake, M. D.

Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression.
Nat.Med. 7 (2001) 425-429

Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., Galiano, R. D., Levine, J. P., and Gurtner, G. C.

Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1.
Nat.Med. 10 (2004) 858-864

- Cercek, B., Fishbein, M. C., Forrester, J. S., Helfant, R. H., and Fagin, J. A.
Induction of insulin-like growth factor I messenger RNA in rat aorta after balloon denudation.
Circ.Res. 66 (1990) 1755-1760
- Chorne, N., Jegatheesan, P., Lin, E., Shi, R., and Clyman, R. I.
Risk factors for persistent ductus arteriosus patency during indomethacin treatment.
J.Pediatr. 151 (2007) 629-634
- Clemetson, J. M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T. N., and Clemetson, K. J.
The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors.
J.Biol.Chem. 274 (1999) 29019-29024
- Clemetson, K. J. and Clemetson, J. M.
Platelet collagen receptors.
Thromb.Haemost. 86 (2001) 189-197
- Clowes, A. W., Clowes, M. M., and Reidy, M. A.
Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels.
Lab Invest 54 (1986) 295-303
- Clowes, A. W., Reidy, M. A., and Clowes, M. M.
Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium.
Lab Invest 49 (1983a) 327-333
- Clowes, A. W., Reidy, M. A., and Clowes, M. M.
Mechanisms of stenosis after arterial injury.
Lab Invest 49 (1983b) 208-215
- Clyman, R. I.
Mechanisms regulating the ductus arteriosus.
Biol.Neonate 89 (2006) 330-335
- Clyman, R. I., Chan, C. Y., Mauray, F., Chen, Y. Q., Cox, W., Seidner, S. R., Lord, E. M., Weiss, H., Waleh, N., Evans, S. M., and Koch, C. J.
Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: the roles of postnatal constriction, hypoxia, and gestation.
Pediatr.Res. 45 (1999) 19-29
- Clyman, R. I., Chen, Y. Q., Chemtob, S., Mauray, F., Kohl, T., Varma, D. R., and Roman, C.
In utero remodeling of the fetal lamb ductus arteriosus: the role of antenatal indomethacin and avascular zone thickness on vasa vasorum proliferation, neointima formation, and cell death.
Circulation 103 (2001) 1806-1812
- Clyman, R. I., Goetzman, B. W., Chen, Y. Q., Mauray, F., Kramer, R. H., Pytela, R., and Schnapp, L. M.
Changes in endothelial cell and smooth muscle cell integrin expression during closure of the ductus arteriosus: an immunohistochemical comparison of the fetal, preterm newborn, and full-term newborn rhesus monkey ductus.
Pediatr.Res. 40 (1996) 198-208

- Clyman, R. I., Mauray, F., Heymann, M. A., and Roman, C.
Effect of gestational age on pulmonary metabolism of prostaglandin E1 & E2.
Prostaglandins 21 (1981) 505-513
- Clyman, R. I., Mauray, F., Roman, C., Rudolph, A. M., and Heymann, M. A.
Circulating prostaglandin E2 concentrations and patent ductus arteriosus in fetal and neonatal lambs.
J.Pediatr. 97 (1980) 455-461
- Clyman, R. I., Seidner, S. R., Kajino, H., Roman, C., Koch, C. J., Ferrara, N., Waleh, N., Mauray, F., Chen, Y. Q., Perkett, E. A., and Quinn, T.
VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus.
Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol 282 (2002a) R199-R206
- Clyman, R. I., Seidner, S. R., Kajino, H., Roman, C., Koch, C. J., Ferrara, N., Waleh, N., Mauray, F., Chen, Y. Q., Perkett, E. A., and Quinn, T.
VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus.
Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol 282 (2002b) R199-R206
- Coceani, F., Bodach, E., White, E., Bishai, I., and Olley, P. M.
Prostaglandin I2 is less relaxant than prostaglandin E2 on the lamb ductus arteriosus.
Prostaglandins 15 (1978) 551-556
- Coceani, F., Kelsey, L., Seidlitz, E., Marks, G. S., McLaughlin, B. E., Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Rabinovitch, M., and Ackerley, C.
Carbon monoxide formation in the ductus arteriosus in the lamb: implications for the regulation of muscle tone.
Br.J.Pharmacol. 120 (1997) 599-608
- Coceani, F., Wright, J., and Breen, C.
Ductus arteriosus: involvement of a sarcolemmal cytochrome P-450 in O2 constriction?
Can.J.Physiol Pharmacol. 67 (1989) 1448-1450
- Cotton, R. B., Stahlman, M. T., Bender, H. W., Graham, T. P., Catterton, W. Z., and Kovar, I.
Randomized trial of early closure of symptomatic patent ductus arteriosus in small preterm infants.
J.Pediatr. 93 (1978) 647-651
- Crichton, C. A., Smith, G. C., and Smith, G. L.
alpha-Toxin-permeabilised rabbit fetal ductus arteriosus is more sensitive to Ca²⁺ than aorta or main pulmonary artery.
Cardiovasc.Res. 33 (1997) 223-229
- Daemen, M. J., Lombardi, D. M., Bosman, F. T., and Schwartz, S. M.
Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall.
Circ.Res. 68 (1991) 450-456
- Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J. B., and Kunapuli, S. P.
Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets.
J.Biol.Chem. 273 (1998) 2024-2029

- Daub, K., Langer, H., Seizer, P., Stellos, K., May, A. E., Goyal, P., Bigalke, B., Schonberger, T., Geisler, T., Siegel-Axel, D., Oostendorp, R. A., Lindemann, S., and Gawaz, M.
Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells.
FASEB J. 20 (2006) 2559-2561
- Davi, G. and Patrono, C.
Platelet activation and atherothrombosis.
N.Engl.J.Med. 357 (2007) 2482-2494
- de Boer, H. C., Verseyden, C., Ulfman, L. H., Zwaginga, J. J., Bot, I., Biessen, E. A., Rabelink, T. J., and van Zonneveld, A. J.
Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 26 (2006) 1653-1659
- de Reeder, E. G., Girard, N., Poelmann, R. E., van Munsteren, J. C., Patterson, D. F., and Gittenberger-De Groot, A. C.
Hyaluronic acid accumulation and endothelial cell detachment in intimal thickening of the vessel wall. The normal and genetically defective ductus arteriosus.
Am.J.Pathol. 132 (1988) 574-585
- de Reeder, E. G., Van Munsteren, C. J., Poelmann, R. E., Patterson, D. F., and Gittenberger-De Groot, A. C.
Changes in distribution of elastin and elastin receptor during intimal cushion formation in the ductus arteriosus.
Anat.Embryol.(Berl) 182 (1990b) 473-480
- de Reeder, E. G., Van Munsteren, C. J., Poelmann, R. E., Patterson, D. F., and Gittenberger-De Groot, A. C.
Changes in distribution of elastin and elastin receptor during intimal cushion formation in the ductus arteriosus.
Anat.Embryol.(Berl) 182 (1990a) 473-480
- de With, A. and Greulich, K. O.
Wavelength dependence of laser-induced DNA damage in lymphocytes observed by single-cell gel electrophoresis.
J.Photochem.Photobiol.B 30 (1995) 71-76
- Denis, C., Methia, N., Frenette, P. S., Rayburn, H., Ullman-Cullere, M., Hynes, R. O., and Wagner, D. D.
A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95 (1998) 9524-9529
- Diacovo, T. G., Puri, K. D., Warnock, R. A., Springer, T. A., and von Andrian, U. H.
Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules.
Science 273 (1996) 252-255
- Dilley, R. J., McGeachie, J. K., and Prendergast, F. J.
A review of the histologic changes in vein-to-artery grafts, with particular reference to intimal hyperplasia.
Arch.Surg. 123 (1988) 691-696

- Doggett, T. A., Girdhar, G., Lawshe, A., Schmidtke, D. W., Laurenzi, I. J., Diamond, S. L., and Diacovo, T. G.
Selectin-like kinetics and biomechanics promote rapid platelet adhesion in flow: the GPIb(alpha)-vWF tether bond.
Biophys.J. 83 (2002) 194-205
- Dong, J. F., Moake, J. L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C. N., Schade, A. J., McIntire, L. V., Fujikawa, K., and Lopez, J. A.
ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions.
Blood 100 (2002) 4033-4039
- Drachman, J. G.
Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP.
Blood 103 (2004) 390-398
- Emambokus, N. R. and Frampton, J.
The glycoprotein IIb molecule is expressed on early murine hematopoietic progenitors and regulates their numbers in sites of hematopoiesis.
Immunity. 19 (2003) 33-45
- Espino-Vela, J., Cardenas, N., and Cruz, R.
Patent ductus arteriosus. With special reference to patients with pulmonary hypertension.
Circulation 38 (1968) 45-60
- Farb, A., Kolodgie, F. D., Hwang, J. Y., Burke, A. P., Tefera, K., Weber, D. K., Wight, T. N., and Virmani, R.
Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries.
Circulation 110 (2004) 940-947
- Farb, A., Sangiorgi, G., Carter, A. J., Walley, V. M., Edwards, W. D., Schwartz, R. S., and Virmani, R.
Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans.
Circulation 99 (1999) 44-52
- Ferns, G. A., Raines, E. W., Sprugel, K. H., Motani, A. S., Reidy, M. A., and Ross, R.
Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.
Science 253 (1991) 1129-1132
- Fingerle, J., Johnson, R., Clowes, A. W., Majesky, M. W., and Reidy, M. A.
Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 86 (1989) 8412-8416
- Fox, J. E., Reynolds, C. C., and Austin, C. D.
The role of calpain in stimulus-response coupling: evidence that calpain mediates agonist-induced expression of procoagulant activity in platelets.
Blood 76 (1990) 2510-2519
- Fox, J. J., Ziegler, J. W., Ivy, D. D., Halbower, A. C., Kinsella, J. P., and Abman, S. H.
Role of nitric oxide and cGMP system in regulation of ductus arteriosus tone in ovine fetus.
Am.J.Physiol 271 (1996) H2638-H2645

- Frenette, P. S., Johnson, R. C., Hynes, R. O., and Wagner, D. D.
Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92 (1995) 7450-7454
- Frenette, P. S., Subbarao, S., Mazo, I. B., von Andrian, U. H., and Wagner, D. D.
Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95 (1998) 14423-14428
- Friedman, Z., Whitman, V., Maisels, M. J., Berman, W., Jr., Marks, K. H., and Vesell, E. S.
Indomethacin disposition and indomethacin-induced platelet dysfunction in premature infants.
J.Clin.Pharmacol. 18 (1978) 272-279
- Friedrich, E. B., Walenta, K., Scharlau, J., Nickenig, G., and Werner, N.
CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities.
Circ.Res. 98 (2006) e20-e25
- Fukiishi, Y. and Morriss-Kay, G. M.
Migration of cranial neural crest cells to the pharyngeal arches and heart in rat embryos.
Cell Tissue Res. 268 (1992) 1-8
- Furukawa, Y., Matsumori, A., Ohashi, N., Shioi, T., Ono, K., Harada, A., Matsushima, K., and Sasayama, S.
Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemoattractant and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries.
Circ.Res. 84 (1999) 306-314
- Gawaz, M.
Platelets in the onset of atherosclerosis.
Blood Cells Mol.Dis. 36 (2006) 206-210
- Gawaz, M., Stellos, K., and Langer, H. F.
Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells.
J.Thromb.Haemost. 6 (2008) 235-242
- George, J. N.
Platelets.
Lancet 355 (2000) 1531-1539
- George, J. N., Caen, J. P., and Nurden, A. T.
Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease.
Blood 75 (1990) 1383-1395
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., and Stein, H.
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.
J.Immunol. 133 (1984) 1710-1715
- Gersony, W. M., Peckham, G. J., Ellison, R. C., Miettinen, O. S., and Nadas, A. S.

- Effects of indomethacin in premature infants with patent ductus arteriosus: results of a national collaborative study.
J.Pediatr. 102 (1983) 895-906
- GIBSON, S. and LEWIS, K. C.
Congenital heart disease following maternal rubella during pregnancy.
AMA.Am.J.Dis.Child 83 (1952) 317-319
- Ginsberg, M. H., Forsyth, J., Lightsey, A., Chediak, J., and Plow, E. F.
Reduced surface expression and binding of fibronectin by thrombin-stimulated thrombasthenic platelets.
J.Clin.Invest 71 (1983) 619-624
- Gittenberger-De Groot, A. C.
Persistent ductus arteriosus, most probably a primary congenital malformation [proceedings].
Acta Morphol.Neerl.Scand. 15 (1977) 91-92
- Gittenberger-De Groot, A. C., Moulaert, A. J., and Hitchcock, J. F.
Histology of the persistent ductus arteriosus in cases of congenital rubella.
Circulation 62 (1980a) 183-186
- Gittenberger-De Groot, A. C., Strengers, J. L., Mentink, M., Poelmann, R. E., and Patterson, D. F.
Histologic studies on normal and persistent ductus arteriosus in the dog.
J.Am.Coll.Cardiol. 6 (1985) 394-404
- Gittenberger-De Groot, A. C., van, E., I, Moulaert, A. J., and Harinck, E.
The ductus arteriosus in the preterm infant: histologic and clinical observations.
J.Pediatr. 96 (1980b) 88-93
- Glanzmann, E.
Hereditäre hämorrhägische Thrombasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie der Blutplättchen.
Jahrbuch für Kinderheilkunde 88 (1918) 113-141
- Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., and Keshet, E.
VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells.
Cell 124 (2006) 175-189
- Gulati, R., Jevremovic, D., Peterson, T. E., Witt, T. A., Kleppe, L. S., Mueske, C. S., Lerman, A., Vile, R. G., and Simari, R. D.
Autologous culture-modified mononuclear cells confer vascular protection after arterial injury.
Circulation 108 (2003) 1520-1526
- Gunsilius, E., Duba, H. C., Petzer, A. L., Kahler, C. M., Grunewald, K., Stockhammer, G., Gabl, C., Dirnhofer, S., Clausen, J., and Gastl, G.
Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells.
Lancet 355 (2000) 1688-1691
- Gurney, A. L., Carver-Moore, K., de Sauvage, F. J., and Moore, M. W.
Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice.

Science 265 (1994) 1445-1447

Hammerman, C., Glaser, J., Kaplan, M., Schimmel, M. S., Ferber, B., and Eidelman, A. I.
Indomethacin tocolysis increases postnatal patent ductus arteriosus severity.
Pediatrics 102 (1998) E56

Hantgan, R. R.

Fibrin protofibril and fibrinogen binding to ADP-stimulated platelets: evidence for a common mechanism.

Biochim.Biophys.Acta 968 (1988) 24-35

Hayashi, S., Watanabe, N., Nakazawa, K., Suzuki, J., Tsushima, K., Tamatani, T., Sakamoto, S., and Isobe, M.

Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries.

Circulation 102 (2000) 1710-1717

Hermes-DeSantis, E. R. and Clyman, R. I.

Patent ductus arteriosus: pathophysiology and management.

J.Perinatol. 26 Suppl 1 (2006) S14-S18

Heymann, M. A. and Rudolph, A. M.

Control of the ductus arteriosus.

Physiol Rev. 55 (1975) 62-78

Hodivala-Dilke, K. M., McHugh, K. P., Tsakiris, D. A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Cullere, M., Ross, F. P., Collier, B. S., Teitelbaum, S., and Hynes, R. O.

Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival.

J.Clin.Invest 103 (1999) 229-238

Hoffman, J. I. and Kaplan, S.

The incidence of congenital heart disease.

J.Am.Coll.Cardiol. 39 (2002) 1890-1900

Hornblad, P. Y.

Studies on closure of the ductus arteriosus. 3. Species differences in closure rate and morphology.

Cardiologia 51 (1967a) 262-282

Hornblad, P. Y. and Larsson, K. S.

Studies on closure of the ductus arteriosus. I. Whole-Body freezing as improvement of fixation procedures.

Cardiologia 51 (1967b) 231-241

Hu, Y., Zhang, Z., Torsney, E., Afzal, A. R., Davison, F., Metzler, B., and Xu, Q.

Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice.

J.Clin.Invest 113 (2004) 1258-1265

Hung, D. T., Vu, T. K., Wheaton, V. I., Ishii, K., and Coughlin, S. R.

Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation.

J.Clin.Invest 89 (1992) 1350-1353

Huo, Y., Schober, A., Forlow, S. B., Smith, D. F., Hyman, M. C., Jung, S., Littman, D. R., Weber, C., and Ley, K.

Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E.

Nat.Med. 9 (2003) 61-67

Hynes, R. O.

Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.

Cell 110 (2002) 673-687

Ikeda, Y., Handa, M., Kawano, K., Kamata, T., Murata, M., Araki, Y., Anbo, H., Kawai, Y., Watanabe, K., Itagaki, I., and .

The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress.

J.Clin.Invest 87 (1991) 1234-1240

Iwata, H. and Sata, M.

Potential contribution of bone marrow-derived precursors to vascular repair and lesion formation: lessons from animal models of vascular diseases.

Front Biosci. 12 (2007) 4157-4167

Jackson, S. P.

The growing complexity of platelet aggregation.

Blood 109 (2007) 5087-5095

Jarkovska, D., Janatova, T., Hrudá, J., Ostadal, B., and Samanek, M.

Effect of prostaglandin E₂ on the ductus arteriosus in the newborn rat. An ultrastructural study.

Physiol Res. 41 (1992) 323-330

Jiang, S., Walker, L., Afentoulis, M., Anderson, D. A., Jauron-Mills, L., Corless, C. L., and Fleming, W. H.

Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101 (2004) 16891-16896

Jin, D. K., Shido, K., Kopp, H. G., Petit, I., Shmelkov, S. V., Young, L. M., Hooper, A. T., Amano, H., Avecilla, S. T., Heissig, B., Hattori, K., Zhang, F., Hicklin, D. J., Wu, Y., Zhu, Z., Dunn, A., Salari, H., Werb, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Lyden, D., and Rafii, S. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4⁺ hemangiocytes.

Nat.Med. 12 (2006) 557-567

Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D. D., Graf, T., Italiano, J. E., Jr., Shivdasani, R. A., and von Andrian, U. H.

Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow.

Science 317 (2007) 1767-1770

Kajino, H., Chen, Y. Q., Chemtob, S., Waleh, N., Koch, C. J., and Clyman, R. I.

Tissue hypoxia inhibits prostaglandin and nitric oxide production and prevents ductus arteriosus reopening.

Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol 279 (2000) R278-R286

- Kajino, H., Chen, Y. Q., Seidner, S. R., Waleh, N., Mauray, F., Roman, C., Chemtob, S., Koch, C. J., and Clyman, R. I.
Factors that increase the contractile tone of the ductus arteriosus also regulate its anatomic remodeling.
Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol 281 (2001) R291-R301
- Kajino, H., Goldberg, S., Roman, C., Liu, B. M., Mauray, F., Chen, Y. Q., Takahashi, Y., Koch, C. J., and Clyman, R. I.
Vasa vasorum hypoperfusion is responsible for medial hypoxia and anatomic remodeling in the newborn lamb ductus arteriosus.
Pediatr.Res. 51 (2002) 228-235
- Karczewski, J., Knudsen, K. A., Smith, L., Murphy, A., Rothman, V. L., and Tuszynski, G. P.
The interaction of thrombospondin with platelet glycoprotein GPIIb-IIIa.
J.Biol.Chem. 264 (1989) 21322-21326
- Kasirer-Friede, A., Cozzi, M. R., Mazzucato, M., De Marco, L., Ruggeri, Z. M., and Shattil, S. J.
Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors.
Blood 103 (2004) 3403-3411
- Kasirer-Friede, A., Kahn, M. L., and Shattil, S. J.
Platelet integrins and immunoreceptors.
Immunol.Rev. 218 (2007) 247-264
- Kieffer, N., Fitzgerald, L. A., Wolf, D., Cheresch, D. A., and Phillips, D. R.
Adhesive properties of the beta 3 integrins: comparison of GP IIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells.
J.Cell Biol. 113 (1991) 451-461
- Kim, H. S., Aikawa, M., Kimura, K., Kuro-o M, Nakahara, K., Suzuki, T., Katoh, H., Okamoto, E., Yazaki, Y., and Nagai, R.
Ductus arteriosus. Advanced differentiation of smooth muscle cells demonstrated by myosin heavy chain isoform expression in rabbits.
Circulation 88 (1993) 1804-1810
- Knight, C. G., Morton, L. F., Onley, D. J., Peachey, A. R., Ichinohe, T., Okuma, M., Farndale, R. W., and Barnes, M. J.
Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen.
Cardiovasc.Res. 41 (1999) 450-457
- Komatsu, R., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., and Becker, A. E.
Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses.
Circulation 98 (1998) 224-233
- Kremmer, E., Kranz, B. R., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H. J., Delsol, G., Bornkamm, G. W., Mueller-Lantzsch, N., and Grassert, F. A.
Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B).

Virology 208 (1995) 336-342

Kriska, M., Smiesko, V., Cerletti, C., and del Maschio, A.
Interaction of prostaglandins and the myogenic factor in the mechanism of closure of the ductus arteriosus.

Physiol Bohemoslov. 39 (1990) 207-216

Kulkarni, S., Dopheide, S. M., Yap, C. L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K. A., Street, A., Harper, I. S., Lanza, F., and Jackson, S. P.

A revised model of platelet aggregation.

J.Clin.Invest 105 (2000) 783-791

Langer, H., May, A. E., Daub, K., Heinzmann, U., Lang, P., Schumm, M., Vestweber, D., Massberg, S., Schonberger, T., Pfisterer, I., Hatzopoulos, A. K., and Gawaz, M.

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

Circ.Res. 98 (2006) e2-10

Langer, H. F., May, A. E., Vestweber, D., de Boer, H. C., Hatzopoulos, A. K., and Gawaz, M.
Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells.

Semin.Thromb.Hemost. 33 (2007) 136-143

Lecine, P., Villeval, J. L., Vyas, P., Swencki, B., Xu, Y., and Shivdasani, R. A.

Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes.

Blood 92 (1998) 1608-1616

Lee, S. H., Wolf, P. L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S. W., and Thistlethwaite, P. A.
Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction.

N.Engl.J.Med. 342 (2000) 626-633

Lentz, B. R.

Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation.

Prog.Lipid Res. 42 (2003) 423-438

Lesnik, P., Haskell, C. A., and Charo, I. F.

Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis.

J.Clin.Invest 111 (2003) 333-340

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N.

Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.

Science 246 (1989) 1306-1309

Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C.

Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.

Genes Dev. 8 (1994) 1875-1887

Levin, J., Peng, J. P., Baker, G. R., Villeval, J. L., Lecine, P., Burstein, S. A., and Shivdasani, R. A.

Pathophysiology of thrombocytopenia and anemia in mice lacking transcription factor NF-E2.

Blood 94 (1999) 3037-3047

- Levin, M., Goldberg, S., Lindqvist, A., Sward, K., Roman, C., Liu, B. M., Hulten, L. M., Boren, J., and Clyman, R. I.
ATP depletion and cell death in the neonatal lamb ductus arteriosus.
Pediatr.Res. 57 (2005) 801-805
- Levy, G. G., Nichols, W. C., Lian, E. C., Foroud, T., McClintick, J. N., McGee, B. M., Yang, A. Y., Siemieniak, D. R., Stark, K. R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S. B., Chandrasekaran, V., Stabler, S. P., Sabio, H., Bouhassira, E. E., Upshaw, J. D., Jr., Ginsburg, D., and Tsai, H. M.
Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura.
Nature 413 (2001) 488-494
- Lindner, V. and Reidy, M. A.
Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88 (1991) 3739-3743
- Liu, P., Patil, S., Rojas, M., Fong, A. M., Smyth, S. S., and Patel, D. D.
CX3CR1 deficiency confers protection from intimal hyperplasia after arterial injury.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 26 (2006) 2056-2062
- Lytton, F. D. and Poyser, N. L.
Prostaglandin production by the rabbit uterus and placenta in vitro.
J.Reprod.Fertil. 66 (1982) 591-599
- Majesky, M. W., Lindner, V., Twardzik, D. R., Schwartz, S. M., and Reidy, M. A.
Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury.
J.Clin.Invest 88 (1991) 904-910
- Majewski, I. J., Metcalf, D., Mielke, L. A., Krebs, D. L., Ellis, S., Carpinelli, M. R., Mifsud, S., Di Rago, L., Corbin, J., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S.
A mutation in the translation initiation codon of Gata-1 disrupts megakaryocyte maturation and causes thrombocytopenia.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 103 (2006) 14146-14151
- Majka, M., Ratajczak, J., Machalinski, B., Carter, A., Pizzini, D., Wasik, M. A., Gewirtz, A. M., and Ratajczak, M. Z.
Expression, regulation and function of AC133, a putative cell surface marker of primitive human haematopoietic cells.
Folia Histochem.Cytobiol. 38 (2000) 53-63
- Massague, J.
The TGF-beta family of growth and differentiation factors.
Cell 49 (1987) 437-438
- Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M.
A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation.
J Exp Med. 196 (2002) 887-96.

Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlhofer, D., Heinzmann, U., and Nieswandt, B.

A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo.
J.Exp.Med. 197 (2003) 41-49

Massberg, S., Konrad, I., Bultmann, A., Schulz, C., Munch, G., Peluso, M., Lorenz, M., Schneider, S., Besta, F., Muller, I., Hu, B., Langer, H., Kremmer, E., Rudelius, M., Heinzmann, U., Ungerer, M., and Gawaz, M.

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

FASEB J. 18 (2004) 397-399

Massberg, S., Konrad, I., Schurzinger, K., Lorenz, M., Schneider, S., Zohlhofer, 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, N. R., Busch, D. H., Frampton, J., and Gawaz, M.

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

J.Exp.Med. 203 (2006) 1221-1233

Massberg, S., Schurzinger, K., Lorenz, M., Konrad, I., Schulz, C., Plesnila, N., Kennerknecht, E., Rudelius, M., Sauer, S., Braun, S., Kremmer, E., Emambokus, N. R., Frampton, J., and Gawaz, M.

Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb.

Circulation 112 (2005) 1180-1188

May, A. E., Kalsch, T., Massberg, S., Herouy, Y., Schmidt, R., and Gawaz, M.

Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells.

Circulation 106 (2002) 2111-2117

Mayadas, T. N. and Wagner, D. D.

von Willebrand factor biosynthesis and processing.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 614 (1991) 153-166

Mayani, H. and Lansdorp, P. M.

Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells.

Stem Cells 16 (1998) 153-165

Mazo, I. B., Gutierrez-Ramos, J. C., Frenette, P. S., Hynes, R. O., Wagner, D. D., and von Andrian, U. H.

Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1.

J.Exp.Med. 188 (1998) 465-474

Mazzucato, M., Spessotto, P., Masotti, A., De Appollonia, L., Cozzi, M. R., Yoshioka, A., Perris, R., Colombatti, A., and De Marco, L.

Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow.

J.Biol.Chem. 274 (1999) 3033-3041

- Michelakis, E., Rebeyka, I., Bateson, J., Olley, P., Puttagunta, L., and Archer, S.
Voltage-gated potassium channels in human ductus arteriosus.
Lancet 356 (2000) 134-137
- Mitchell, S. C., Korones, S. B., and Berendes, H. W.
Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history.
Circulation 43 (1971) 323-332
- Moake, J. L., Rudy, C. K., Troll, J. H., Weinstein, M. J., Colannino, N. M., Azocar, J., Seder, R. H., Hong, S. L., and Deykin, D.
Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura.
N.Engl.J.Med. 307 (1982) 1432-1435
- Momma, K. and Toyono, M.
The role of nitric oxide in dilating the fetal ductus arteriosus in rats.
Pediatr.Res. 46 (1999) 311-315
- Nadas, A. S.
Indomethacin and the patent ductus arteriosus.
N.Engl.J.Med. 305 (1981) 97-98
- Nair, S., Ghosh, K., Kulkarni, B., Shetty, S., and Mohanty, D.
Glanzmann's thrombasthenia: updated.
Platelets. 13 (2002) 387-393
- Nakamura, T., Kambayashi, J., Okuma, M., and Tandon, N. N.
Activation of the GP IIb-IIIa complex induced by platelet adhesion to collagen is mediated by both alpha2beta1 integrin and GP VI.
J.Biol.Chem. 274 (1999) 11897-11903
- Nakanishi, T., Gu, H., Hagiwara, N., and Momma, K.
Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit.
Circ.Res. 72 (1993) 1218-1228
- Narayanan, M., Cooper, B., Weiss, H., and Clyman, R. I.
Prophylactic indomethacin: factors determining permanent ductus arteriosus closure.
J.Pediatr. 136 (2000) 330-337
- Newby, A. C. and Zaltsman, A. B.
Molecular mechanisms in intimal hyperplasia.
J.Pathol. 190 (2000) 300-309
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Eckly, A., Schulte, V., Ohlmann, P., Cazenave, J. P., Zirngibl, H., Offermanns, S., and Gachet, C.
Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation.
Blood 97 (2001a) 3829-3835
- Nieswandt, B., Bergmeier, W., Schulte, V., Rackebrandt, K., Gessner, J. E., and Zirngibl, H.
Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain.
J.Biol.Chem. 275 (2000) 23998-24002

Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H., and Fassler, R.
Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen.
EMBO J. 20 (2001b) 2120-2130

Nieswandt, B., Schulte, V., Bergmeier, W., Mokhtari-Nejad, R., Rackebrandt, K., Cazenave, J. P., Ohlmann, P., Gachet, C., and Zirngibl, H.
Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice.
J.Exp.Med. 193 (2001c) 459-469

Nieswandt, B. and Watson, S. P.
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?
Blood 102 (2003) 449-461

Norton, M. E., Merrill, J., Cooper, B. A., Kuller, J. A., and Clyman, R. I.
Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor.
N.Engl.J.Med. 329 (1993) 1602-1607

Nurden, A. T.
Glanzmann thrombasthenia.
Orphanet.J.Rare.Dis. 1 (2006) 10

Nurden, A. T. G. J. N.
Inherited abnormalities of the platelet membrane: Glanzmann's thrombasthenia, Bernard-Soulier syndrome, and other disorders, in "Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice" VI edition. Edited by: RW.Colman, VJ. Marder, AW. Clowes, George JN., Goldhaber SZ.
Lippincott, Williams & Wilkins Philadelphia (2005) 987-1010

Pace-Asciak, C. R. and Rangaraj, G.
Release of prostaglandins from intact fetal lamb ductus arteriosus.
Can.J.Biochem.Cell Biol. 61 (1983) 240-247

Pakala, R., Willerson, J. T., and Benedict, C. R.
Effect of serotonin, thromboxane A₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation.
Circulation 96 (1997) 2280-2286

Parker, R. I. and Gralnick, H. R.
Identification of platelet glycoprotein IIb/IIIa as the major binding site for released platelet-von Willebrand factor.
Blood 68 (1986) 732-736

Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., and Rafii, S.
Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.
Blood 95 (2000) 952-958

Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben Hur, H., Lapidot, T., and Alon, R.
The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow.

J.Clin.Invest 104 (1999) 1199-1211

Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M. M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., Zipori, D., and Lapidot, T.

The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice.

Blood 95 (2000) 3289-3296

Peters, L. L., McFarland-Starr, E. C., Wood, B. G., and Barker, J. E.

Heritable severe combined anemia and thrombocytopenia in the mouse: description of the disease and successful therapy.

Blood 76 (1990) 745-754

Petrich, B. G., Marchese, P., Ruggeri, Z. M., Spiess, S., Weichert, R. A., Ye, F., Tiedt, R., Skoda, R. C., Monkley, S. J., Critchley, D. R., and Ginsberg, M. H.

Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis.

J.Exp.Med. 204 (2007) 3103-3111

Pillarisetti, K. and Gupta, S. K.

Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction.

Inflammation 25 (2001) 293-300

Plate, K. H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A., and Risau, W.

Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis.

Cancer Res. 53 (1993) 5822-5827

Ponomaryov, T., Peled, A., Petit, I., Taichman, R. S., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Magerus, A., Caruz, A., Fujii, N., Nagler, A., Lahav, M., Szyper-Kravitz, M., Zipori, D., and Lapidot, T.

Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function.

J.Clin.Invest 106 (2000) 1331-1339

Romijn, R. A., Bouma, B., Wuyster, W., Gros, P., Kroon, J., Sixma, J. J., and Huizinga, E. G. Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain.

J.Biol.Chem. 276 (2001) 9985-9991

Romo, G. M., Dong, J. F., Schade, A. J., Gardiner, E. E., Kansas, G. S., Li, C. Q., McIntire, L. V., Berndt, M. C., and Lopez, J. A.

The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin.

J.Exp.Med. 190 (1999) 803-814

Ross, R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.

Nature 362 (1993) 801-809

Ross, R.

Atherosclerosis--an inflammatory disease.

N.Engl.J.Med. 340 (1999) 115-126

- Ross, R., Masuda, J., and Raines, E. W.
Cellular interactions, growth factors, and smooth muscle proliferation in atherogenesis.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 598 (1990) 102-112
- Ruggeri, Z. M.
Mechanisms initiating platelet thrombus formation.
Thromb.Haemost. 78 (1997a) 611-616
- Ruggeri, Z. M.
von Willebrand factor.
J.Clin.Invest. 99 (1997b) 559-564
- Ruggeri, Z. M.
Platelets in atherothrombosis.
Nat.Med. 8 (2002) 1227-1234
- Ruggeri, Z. M.
Von Willebrand factor.
Curr.Opin.Hematol. 10 (2003) 142-149
- Ruggeri, Z. M., Bader, R., and De Marco, L.
Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 79 (1982) 6038-6041
- Ruggeri, Z. M., Dent, J. A., and Saldivar, E.
Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood.
Blood 94 (1999) 172-178
- Ruggeri, Z. M. and Mendolicchio, G. L.
Adhesion mechanisms in platelet function.
Circ.Res. 100 (2007) 1673-1685
- Sadler, J. E.
Biochemistry and genetics of von Willebrand factor.
Annu.Rev.Biochem. 67 (1998) 395-424
- Sahara, M., Sata, M., Matsuzaki, Y., Tanaka, K., Morita, T., Hirata, Y., Okano, H., and Nagai, R.
Comparison of various bone marrow fractions in the ability to participate in vascular remodeling after mechanical injury.
Stem Cells 23 (2005) 874-878
- Saiura, A., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., and Makuuchi, M.
Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis.
Nat.Med. 7 (2001) 382-383
- Salomon, R. N., Hughes, C. C., Schoen, F. J., Payne, D. D., Pober, J. S., and Libby, P.
Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells.
Am.J.Pathol. 138 (1991) 791-798
- Sata, M.

- Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 26 (2006) 1008-1014
- Sata, M., Maejima, Y., Adachi, F., Fukino, K., Saiura, A., Sugiura, S., Aoyagi, T., Imai, Y., Kurihara, H., Kimura, K., Omata, M., Makuuchi, M., Hirata, Y., and Nagai, R.
A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia.
J.Mol.Cell Cardiol. 32 (2000) 2097-2104
- Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., and Nagai, R.
Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis.
Nat.Med. 8 (2002) 403-409
- Sata, M., Tanaka, K., and Nagai, R.
Origin of smooth muscle progenitor cells: different conclusions from different models.
Circulation 107 (2003) e106-e107
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z. M.
Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow.
Cell 94 (1998) 657-666
- Savage, B., Cattaneo, M., and Ruggeri, Z. M.
Mechanisms of platelet aggregation.
Curr.Opin.Hematol. 8 (2001) 270-276
- Savage, B., Saldivar, E., and Ruggeri, Z. M.
Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor.
Cell 84 (1996) 289-297
- Savage, B., Sixma, J. J., and Ruggeri, Z. M.
Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99 (2002) 425-430
- Schneider, D. J. and Moore, J. W.
Patent ductus arteriosus.
Circulation 114 (2006) 1873-1882
- Schneider, S. W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R. R., and Schneider, M. F.
Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 104 (2007) 7899-7903
- Schober, A., Knarren, S., Lietz, M., Lin, E. A., and Weber, C.
Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice.
Circulation 108 (2003) 2491-2497

Schober, A., Manka, D., von Hundelshausen, P., Huo, Y., Hanrath, P., Sarembock, I. J., Ley, K., and Weber, C.

Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury.

Circulation 106 (2002) 1523-1529

Schober, A. and Weber, C.

Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury.

Antioxid.Redox.Signal. 7 (2005) 1249-1257

Schober, A. and Zerneck, A.

Chemokines in vascular remodeling.

Thromb.Haemost. 97 (2007) 730-737

Schober, A., Zerneck, A., Liehn, E. A., von Hundelshausen, P., Knarren, S., Kuziel, W. A., and Weber, C.

Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets.

Circ.Res. 95 (2004) 1125-1133

Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Cooray, P., Salem, H. H., and Jackson, S. P.

Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin α IIb β 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots.

J.Biol.Chem. 272 (1997) 1694-1702

Schulz, C., Schafer, A., Stolla, M., Kerstan, S., Lorenz, M., von Bruhl, M. L., Schiemann, M., Bauersachs, J., Gloe, T., Busch, D. H., Gawaz, M., and Massberg, S.

Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets.

Circulation 116 (2007) 764-773

Schutze, K. and Lahr, G.

Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells.

Nat.Biotechnol. 16 (1998) 737-742

Schwartz, R. S.

Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling.

Am.J.Cardiol. 81 (1998) 14E-17E

Schwartz, S. M.

Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis.

J.Clin.Invest 100 (1997) S87-S89

Schwartz, S. M., deBlois, D., and O'Brien, E. R.

The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis.

Circ.Res. 77 (1995) 445-465

Seidner, S. R., Chen, Y. Q., Oprysko, P. R., Mauray, F., Tse, M. M., Lin, E., Koch, C., and Clyman, R. I.

Combined prostaglandin and nitric oxide inhibition produces anatomic remodeling and closure of the ductus arteriosus in the premature newborn baboon.

Pediatr.Res. 50 (2001) 365-373

- Shattil, S. J., Hoxie, J. A., Cunningham, M., and Brass, L. F.
Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation.
J.Biol.Chem. 260 (1985) 11107-11114
- Shattil, S. J., Kashiwagi, H., and Pampori, N.
Integrin signaling: the platelet paradigm.
Blood 91 (1998) 2645-2657
- Shattil, S. J. and Newman, P. J.
Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets.
Blood 104 (2004) 1606-1615
- Shen, H., Cheng, T., Olszak, I., Garcia-Zepeda, E., Lu, Z., Herrmann, S., Fallon, R., Luster, A. D., and Scadden, D. T.
CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells.
J.Immunol. 166 (2001) 5027-5033
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., and Hammond, W. P.
Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.
Blood 92 (1998) 362-367
- Shimizu, K., Sugiyama, S., Aikawa, M., Fukumoto, Y., Rabkin, E., Libby, P., and Mitchell, R. N.
Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy.
Nat.Med. 7 (2001) 738-741
- Shivdasani, R. A.
The role of transcription factor NF-E2 in megakaryocyte maturation and platelet production.
Stem Cells 14 Suppl 1 (1996) 112-115
- Shivdasani, R. A. and Orkin, S. H.
Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92 (1995a) 8690-8694
- Shivdasani, R. A., Rosenblatt, M. F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C. W., Hunt, P., Saris, C. J., and Orkin, S. H.
Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development.
Cell 81 (1995b) 695-704
- Silver, M. M., Freedom, R. M., Silver, M. D., and Olley, P. M.
The morphology of the human newborn ductus arteriosus: a reappraisal of its structure and closure with special reference to prostaglandin E1 therapy.
Hum.Pathol. 12 (1981) 1123-1136
- Simon, D. I., Chen, Z., Xu, H., Li, C. Q., Dong, J., McIntire, L. V., Ballantyne, C. M., Zhang, L., Furman, M. I., Berndt, M. C., and Lopez, J. A.
Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).
J.Exp.Med. 192 (2000) 193-204

- Simper, D., Stalboerger, P. G., Panetta, C. J., Wang, S., and Caplice, N. M.
Smooth muscle progenitor cells in human blood.
Circulation 106 (2002) 1199-1204
- Sixma, J. J., van Zanten, G. H., Saelman, E. U., Verkleij, M., Lankhof, H., Nieuwenhuis, H. K., and de Groot, P. G.
Platelet adhesion to collagen.
Thromb.Haemost. 74 (1995) 454-459
- Slomp, J., Gittenberger-De Groot, A. C., Glukhova, M. A., Conny, v. M., Kockx, M. M., Schwartz, S. M., and Koteliansky, V. E.
Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arteriosus.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 17 (1997) 1003-1009
- Slomp, J., van Munsteren, J. C., Poelmann, R. E., de Reeder, E. G., Bogers, A. J., and Gittenberger-De Groot, A. C.
Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components.
Atherosclerosis 93 (1992) 25-39
- Smith, G. C. and McGrath, J. C.
Indomethacin, but not oxygen tension, affects the sensitivity of isolated neonatal rabbit ductus arteriosus, but not aorta, to noradrenaline.
Cardiovasc.Res. 22 (1988) 910-915
- Smith, G. C. and McGrath, J. C.
Prostaglandin E2 and fetal oxygen tension synergistically inhibit response of isolated fetal rabbit ductus arteriosus to norepinephrine.
J.Cardiovasc.Pharmacol. 17 (1991) 861-866
- Smith, G. C. and McGrath, J. C.
Contractile effects of prostanoids on fetal rabbit ductus arteriosus.
J.Cardiovasc.Pharmacol. 25 (1995) 113-118
- Smith, J. W., Piotrowicz, R. S., and Mathis, D.
A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins.
J.Biol.Chem. 269 (1994) 960-967
- Soriano, P.
Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice.
Genes Dev. 8 (1994) 1888-1896
- Sporn, L. A., Marder, V. J., and Wagner, D. D.
von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively.
Blood 69 (1987) 1531-1534
- Srinivasan, R.
Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers.
Science 234 (1986) 559-565

Stellos, K., Langer, H., Daub, K., Schoenberger, T., Gauss, A., Geisler, T., Bigalke, B., Mueller, I., Schumm, M., Schaefer, I., Seizer, P., Kraemer, B. F., Siegel-Axel, D., May, A. E., Lindemann, S., and Gawaz, M.

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

Circulation 117 (2008) 206-215

Sugiyama, T., Okuma, M., Ushikubi, F., Sensaki, S., Kanaji, K., and Uchino, H.

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

Blood 69 (1987) 1712-1720

Tada, T. and Kishimoto, H.

Ultrastructural and histological studies on closure of the mouse ductus arteriosus.

Acta Anat.(Basel) 139 (1990) 326-334

Tada, T., Wakabayashi, T., Nakao, Y., Ueki, R., Ogawa, Y., Inagawa, A., Shibata, T., and Kishimoto, H.

Human ductus arteriosus. A histological study on the relation between ductal maturation and gestational age.

Acta Pathol.Jpn. 35 (1985) 23-34

Takahashi, Y., Roman, C., Chemtob, S., Tse, M. M., Lin, E., Heymann, M. A., and Clyman, R. I.

Cyclooxygenase-2 inhibitors constrict the fetal lamb ductus arteriosus both in vitro and in vivo.

Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol 278 (2000) R1496-R1505

Takamatsu, J., Horne, M. K., III, and Gralnick, H. R.

Identification of the thrombin receptor on human platelets by chemical crosslinking.

J.Clin.Invest 77 (1986) 362-368

Tanaka, K., Sata, M., Hirata, Y., and Nagai, R.

Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries.

Circ.Res. 93 (2003) 783-790

Tannenbaum, J. E., Waleh, N. S., Mauray, F., Gold, L., Perkett, E. A., and Clyman, R. I.

Transforming growth factor-beta protein and messenger RNA expression is increased in the closing ductus arteriosus.

Pediatr.Res. 39 (1996) 427-434

Taubman, M. B., Rollins, B. J., Poon, M., Marmur, J., Green, R. S., Berk, B. C., and Nadal-Ginard, B.

JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells.

Circ.Res. 70 (1992) 314-325

The Vermont-Oxford Trials Network

The Vermont-Oxford Trials Network: very low birth weight outcomes for 1990. Investigators of the Vermont-Oxford Trials Network Database Project.

Pediatrics 91 (1993) 540-545

- Theilmeyer, G., Michiels, C., Spaepen, E., Vreys, I., Collen, D., Vermylen, J., and Hoylaerts, M. F.
Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia.
Blood 99 (2002) 4486-4493
- Thiagarajan, P. and Kelly, K. L.
Exposure of binding sites for vitronectin on platelets following stimulation.
J.Biol.Chem. 263 (1988) 3035-3038
- Thyberg, J.
Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury.
Histol.Histopathol. 13 (1998) 871-891
- Thyberg, J., Blomgren, K., Roy, J., Tran, P. K., and Hedin, U.
Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin.
J.Histochem.Cytochem. 45 (1997) 837-846
- Tsuji, M., Ezumi, Y., Arai, M., and Takayama, H.
A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets.
J.Biol.Chem. 272 (1997) 23528-23531
- Urbich, C. and Dimmeler, S.
Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology.
Circ.Res. 95 (2004) 343-353
- Van Overmeire, B. and Chemtob, S.
The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus.
Semin.Fetal Neonatal Med. 10 (2005) 177-184
- Varughese, K. I., Celikel, R., and Ruggeri, Z. M.
Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain.
Curr.Protein Pept.Sci. 3 (2002) 301-312
- Virmani, R. and Farb, A.
Pathology of in-stent restenosis.
Curr.Opin.Lipidol. 10 (1999) 499-506
- Wagner, C. L., Mascelli, M. A., Neblock, D. S., Weisman, H. F., Collier, B. S., and Jordan, R. E.
Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets.
Blood 88 (1996) 907-914
- Wagner, D. D.
Cell biology of von Willebrand factor.
Annu.Rev.Cell Biol. 6 (1990) 217-246
- Wagner, D. D. and Burger, P. C.
Platelets in inflammation and thrombosis.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 23 (2003) 2131-2137

- Waleh, N., Seidner, S., McCurnin, D., Yoder, B., Liu, B. M., Roman, C., Mauray, F., and Clyman, R. I.
The role of monocyte-derived cells and inflammation in baboon ductus arteriosus remodeling.
Pediatr.Res. 57 (2005) 254-262
- Walsh, K., Smith, R. C., and Kim, H. S.
Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture.
Circ.Res. 87 (2000) 184-188
- Walsh, R. S., Ely, S. W., and Mentzer, R. M., Jr.
Response of lamb ductus arteriosus to nitroglycerin and nitroprusside.
J.Surg.Res. 44 (1988) 8-13
- Ward, M. R., Pasterkamp, G., Yeung, A. C., and Borst, C.
Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications.
Circulation 102 (2000) 1186-1191
- Watson, S. P., Asazuma, N., Atkinson, B., Berlanga, O., Best, D., Bobe, R., Jarvis, G., Marshall, S., Snell, D., Stafford, M., Tulasne, D., Wilde, J., Wonerow, P., and Frampton, J.
The role of.
Thromb.Haemost. 86 (2001) 276-288
- Watson, S. P., Auger, J. M., McCarty, O. J., and Pearce, A. C.
GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets.
J.Thromb.Haemost. 3 (2005) 1752-1762
- Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J., Pickford, A. R., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H., and Campbell, I. D.
Structural basis of integrin activation by talin.
Cell 128 (2007) 171-182
- Weiser, M. C., Majack, R. A., Tucker, A., and Orton, E. C.
Static tension is associated with increased smooth muscle cell DNA synthesis in rat pulmonary arteries.
Am.J.Physiol 268 (1995) H1133-H1138
- Weiss, H. J., Sussman, I. I., and Hoyer, L. W.
Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease.
J.Clin.Invest 60 (1977) 390-404
- Weiss, H. J., Turitto, V. T., and Baumgartner, H. R.
Further evidence that glycoprotein IIb-IIIa mediates platelet spreading on subendothelium.
Thromb.Haemost. 65 (1991) 202-205
- Wenzel, U. O., Fouqueray, B., Grandaliano, G., Kim, Y. S., Karamitsos, C., Valente, A. J., and Abboud, H. E.
Thrombin regulates expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular smooth muscle cells.
Circ.Res. 77 (1995) 503-509
- Werner, N., Junk, S., Laufs, U., Link, A., Walenta, K., Bohm, M., and Nickenig, G.

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

Circ.Res. 93 (2003) e17-e24

Wight, T. N.

The extracellular matrix and atherosclerosis.

Curr.Opin.Lipidol. 6 (1995) 326-334

Wolinsky, H. and Glagov, S.

Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals.

Circ.Res. 20 (1967) 409-421

Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A.

Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand.

Science 296 (2002) 151-155

Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D. W., Isner, J. M., and Asahara, T.

Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.

Circulation 107 (2003) 1322-1328

Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D. W.

AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.

Blood 90 (1997) 5002-5012

Yoder, M. J., Baumann, F. G., Grover-Johnson, N. M., Brick, I., and Imparato, A. M.

A morphological study of early cellular changes in the closure of the rabbit ductus arteriosus.

Anat.Rec. 192 (1978) 19-39

Zernecke, A., Schober, A., Bot, I., von Hundelshausen, P., Liehn, E. A., Mopps, B.,

Mericskay, M., Gierschik, P., Biessen, E. A., and Weber, C.

SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells.

Circ.Res. 96 (2005) 784-791

Zhang, L. N., Wilson, D. W., da, C., V, Sullivan, M. E., Vergona, R., Rutledge, J. C., and Wang, Y. X.

Endothelial NO synthase deficiency promotes smooth muscle progenitor cells in association with upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha in a mouse model of carotid artery ligation.

Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 26 (2006) 765-772

10 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Versuchsplan | 28 |
| Tabelle 2: Sequenz der PCR-Primer | 46 |
| Tabelle 3: rtPCR Ergebnisse der Proben der Laser-Mikrodissektion | 65 |
| Tabelle 4: Immunhistologischer Nachweis der Expression von Oberflächenmarker | 66 |

11 **Abbildungsverzeichnis**

| | |
|---|-----------|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der fetalen Kreislaufsituation | 4 |
| aus William, C., Fetal Circulation, http://www.health.uab.edu/14535/ Stand 13.11.2009 | |
| Abbildung 2: Kreislaufverhältnisse beim persistierenden Ductus arteriosus | 9 |
| aus Meyers, B, Pathophysiology of PDA, http://www.uptodateonline.com/online/content/image.do=3fimageKey=3dcard _pix_/pathop11.htm&title=3dPathophysiology%20PDA, Stand 16.10.2009 | |
| Abbildung 3: Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf subendothelialer Matrix | 14 |
| aus Varga-Szabo et al.. Cell adhesion mechanisms in platelets. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 28 (2008) 403-412 | |
| Abbildung 4: Adhärenz Thrombozyten rekrutieren Progenitorzellen aus dem Knochenmark zu Gefäßverletzungen | 19 |
| aus Massberg, S. et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. J.Exp.Med. 203 (2006) 1221-1233 | |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der Neointimaformation nach Angioplastie | 22 |
| aus Weintraub, W. S. The pathophysiology and burden of restenosis. Am.J.Cardiol. 100 (2007) 3K-9K | |
| Abbildung 6: Anfertigung von Paraffinpräparaten des Ductus arteriosus | 31 |
| Abbildung 7: Darstellung der histomorphometrischen Ausmessung des DA | 42 |
| Abbildung 8: Darstellung der Laser-Mikrodissektion des Ductus arteriosus | 45 |
| Abbildung 9: Morphologie des Verschlusses des DA im Zeitverlauf | 49 |
| Abbildung 10: Thrombozyten und Substrate der Thrombusbildung im DA | 51 |
| Abbildung 11: Angiographie des DA | 53 |
| Abbildung 12: Morphologie des DA nach Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion | 55 |
| Abbildung 13: Zellzahl im DA innerhalb der Lamina elastica interna | 57 |
| Abbildung 14: Proliferation im DA im Vergleich zwischen GPIIb^{+/+} und GPIIb^{-/-} | 58 |

| | |
|---|-----------|
| Abbildung 15: Beteiligung der SDF-1/CXCR4-Achse am Verschluss des DA | 60 |
| Abbildung 16: Charakterisierung der luminalen Zellen im DA eine Stunde postnatal | 63 |
| Abbildung 17: Charakterisierung der luminalen Zellen des DA mittels rtPCR | 65 |
| Abbildung 18: Entwicklung der Expression der Oberflächenmarker im DA | 67 |

12 Danksagung

Bei Prof. Dr. med. Maßberg möchte ich mich für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und die stete fachliche Unterstützung bedanken. Die Beratung und Einbringung neuer Impulse war sehr hilfreich bei der Anfertigung dieser Arbeit im Labor der experimentellen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Dr. med. vet. Katrin Echtler, die mit ihrem Enthusiasmus und ihrer Beharrlichkeit diese Arbeit ermöglicht und immer sehr konstruktiv begleitet hat. Die äußerst angenehme Zusammenarbeit und extrem engagierte Betreuung war sehr wertvoll und hat mir große Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt. Durch ihre hervorragende Unterstützung hat sie wesentlich zum Erfolg dieser Doktorarbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Michael Lorenz für die sehr freundliche und kompetente Unterstützung bedanken, die mir die Arbeit sehr erleichtert hat. Ebenfalls möchte ich mich bei Sandra Kerstan und Lena Orschiedt für die hilfsbereite Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Renate Hegenloh aus dem Institut für Pathologie der TU München, die mich sehr kompetent in die Methode der Immunhistologie eingeführt hat und so den Erfolg dieser Arbeit gewährleistet hat.

Auch die Zusammenarbeit mit Andrea Voss und Axel Walch hat sich als sehr erfreulich erwiesen, sodass ich mich für die Unterstützung bei der Laser-Mikrodissektion und der Ermöglichung der Arbeit in den Labors des Helmholtzzentrums München herzlich bedanken möchte.