

**Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Bedeutung von Urokinase-Plasminogen-Aktivator
für das Wachstum und die Stabilität
arteriosklerotischer Gefäßläsionen im
Apolipoprotein-E-Knockout-Mausmodell**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
zu Göttingen**

**vorgelegt von
Carmen Schremmer**

**aus
Salzgitter-Bad**

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

- I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. K. Schäfer**
- II. Berichterstatter/-in:**
- III. Berichterstatter/-in:**

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1 Pathogenetische Grundlagen der Arteriosklerose	10
1.2 Das Apolipoprotein-E-Knockout-Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenese arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen	15
1.3 Die Bedeutung des Plasmin-/ Plasminogen-Systems für die Pathophysiologie der Arteriosklerose	20
1.4 Die Pathophysiologische Bedeutung des Urokinase- Plasminogen-Aktivators im Rahmen der Arteriosklerose	23
1.5 Ziele der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Versuchstiere	28
2.1.1 Genotypisierung	28
2.1.2 Diätetische Induktion einer Hypercholesterinämie	31
2.2 Induktion experimenteller Verletzungen der A. carotis mit Hilfe des Eisenchloridmodells	31
2.3 Morphometrische Quantifizierung experimentell-induzierter und spontaner atherosklerotischer Läsionen	32
2.4 Histologische Analyse der Plaquezusammensetzung und der Plaquivulnerabilität	34
2.5 Immunhistochemische Analyse der Plaquezusammensetzung und der Plaquivulnerabilität	36

2.6 Laborchemische Untersuchungen	37
2.7 Statistische Auswertungen	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung der experimentell erzeugten Gefäßläsionen	38
3.1.1 Einfluss des Fehlens von uPA auf Körpergewicht und Blutfettwerte	38
3.1.2 Einfluss des Fehlens von uPA auf die akute thrombotische Reaktion nach Gefäßwandverletzung	40
3.1.3 Einfluss des Fehlens von uPA auf die chronische Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung	42
3.2 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Gefäßläsionen	55
3.2.1 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Läsionen der Aortenwurzel	55
3.2.2 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Läsionen der Koronararterien	61
3.2.3 Einfluss von Urokinase-Plasminogen- Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Läsionen der Brachiozephalarterien	69
3.3 Einfluss des Urokinase-Plasminogen-Aktivators auf die Stabilität arteriosklerotischer Läsionen	75
4. Diskussion	78
4.1 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und arterielle Thrombose	79
4.2 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Fibrinolyse	80
4.3 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Neointimabildung	83

4.4 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Arteriosklerose	86
4.5 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Plaqueinstabilität	89
5. Zusammenfassung	96
6. Anhang	
Aus dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen	99
7. Literaturverzeichnis	100

Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u>	10
Makroskopische Darstellung einer humanen arteriosklerotischen Plaque an der Karotisbifurkation	
<u>Abbildung 2:</u>	14
Schematische Darstellung der Initiation, Progression und Komplikation arteriosklerotischer Plaques	
<u>Abbildung 3:</u>	21
Schematische Darstellung des Plasmin-/ Plasminogen-Systems	
<u>Abbildung 4:</u>	40
Zusammenfassende Darstellung der einzelnen und medianen Zeiten bis zum thrombotischen Gefäßverschluss	
<u>Abbildung 1:</u>	41
Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils der nach 25 Minuten rekanalisierten Gefäße	
<u>Abbildung 6:</u>	42
Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils der nach 3 Wochen rekanalisierten Gefäße	
<u>Abbildung 7:</u>	43
Repräsentative Abbildung einer Neointima 3 Wochen nach Gefäßverletzung im apoE-KO- bzw. DKO-Mausmodell	
<u>Abbildung 8:</u>	44
Zusammenfassende Darstellung der Neointimafläche 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	

<u>Abbildung 9:</u>	45
Zusammenfassende Darstellung der prozentualen Lumenstenose 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	
<u>Abbildung 10:</u>	46
Zusammenfassende Darstellung der Mediafläche 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	
<u>Abbildung 11:</u>	47
Zusammenfassende Darstellung des Intima-Media-Quotienten 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	
<u>Abbildung 12:</u>	48
Zusammenfassende Darstellung der Gefäßgesamtflächen 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	
<u>Abbildung 13:</u>	49
Repräsentative Abbildungen nach immunhistochemischer Anfärbung von α -Aktin innerhalb der Neointima	
<u>Abbildung 14:</u>	50
Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils α -Aktin-positiver Flächen 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	
<u>Abbildung 15:</u>	51
Repräsentative Abbildungen nach immunhistochemischer Anfärbung von Fibrinogen und Fibrin	
<u>Abbildung 16:</u>	52
Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils Fibrinogen/Fibrin-positiver Fläche 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	
<u>Abbildung 17:</u>	56
Repräsentative Abbildungen spontaner arteriosklerotischer Läsionen an der Aortenwurzel im apoE-KO- bzw. DKO-Mausmodell	
<u>Abbildung 18:</u>	57
Zusammenfassende Darstellung der Fläche arteriosklerotischer Läsionen an der Aortenwurzel 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 19:</u>	58
Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils Fibrinogen/Fibrin-positiver Flächen der arteriosklerotischen Plaques an der Aortenwurzel 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 20:</u>	59
Repräsentative Bilder nach immunhistochemischer Anfärbung von α -Aktin in arteriosklerotischen Plaques an der Aortenwurzel 12 Monate-alter Mäuse	

<u>Abbildung 21:</u>	60
Zusammenfassende Darstellung der Zellularität arteriosklerotischer Plaques der Aortenwurzel 12 Monate-alter Mäuse	
<u>Abbildung 22:</u>	61
Repräsentative Abbildung arteriosklerotische Plaques innerhalb der Koronararterien 12 Monate-alter Mäuse	
<u>Abbildung 23:</u>	61
Zusammenfassende Darstellung der Gesamtfläche arteriosklerotischer Plaques in den Koronararterien 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 24:</u>	62
Zusammenfassende Darstellung der Lumenstenose in den Koronararterien 12 Monate-alter Mäuse	
<u>Abbildung 25:</u>	63
Zusammenfassende Darstellung der Mediafläche in den Koronararterien 12 Monate-alter Mäuse	
<u>Abbildung 26:</u>	64
Zusammenfassende Darstellung des Intima-Media-Quotienten in den Koronararterien 12 Monate-alter Mäuse	
<u>Abbildung 27:</u>	65
Darstellung der Gefäßgesamtfläche in den Koronararterien 12 Monate-alter Mäuse	
<u>Abbildung 28:</u>	66
Repräsentative Bilder nach immunhistochemischer Anfärbung von α -Aktin in arteriosklerotischen Plaques der Koronararterien 12 Monate-alter Mäuse	
<u>Abbildung 29:</u>	66
Zusammenfassende Darstellung der α -Aktin-positiven Flächen arteriosklerotischer Koronarplaques	
<u>Abbildung 30:</u>	67
Zusammenfassende Darstellung der Fibrin- und Fibrinogen-positiven Flächen arteriosklerotischer Koronarplaques.	
<u>Abbildung 31:</u>	68
Zusammenfassende Darstellung der Zellularität arteriosklerotischer Koronarplaques.	
<u>Abbildung 32:</u>	69
Repräsentative Abbildung arteriosklerotischer Plaques an der <i>A. brachiocephalica</i> 12 Monate alter Mäuse	

<u>Abbildung 33:</u>	70
Darstellung der Plaquefläche in den Brachizephalarterien 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 34:</u>	71
Darstellung der Lumenstenose in den Brachiozephalarterien 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 35:</u>	72
Repräsentative Abbildung arteriosklerotischer Plaques in der <i>A. brachiocephalica</i> 12 Monate alter Mäuse nach immunhistochemischer Färbung für α -Aktin	
<u>Abbildung 36:</u>	72
Darstellung der α -Aktin-positiven Fläche in den Brachiozephalarterien 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 37:</u>	73
Repräsentative Abbildung nach Picrosiriusrotfärbung einer arteriosklerotischen Plaque in der <i>A. brachiocephalica</i> 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 38:</u>	74
Darstellung der Fibrin- und Fibrinogen-positiven Fläche in den Brachiozephalarterien 12 Monate alter Mäuse	
<u>Abbildung 39:</u>	77
Repräsentatives Beispiel einer Plaqueruptur bei einer DKO-Maus	

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u>	39
Körpergewicht und Blutfettwerte zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme	
<u>Tabelle 2:</u>	53
Histologische Marker für Plaquestabilität/-instabilität einer Neointima 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung	
<u>Tabelle 3:</u>	75
Histologische Marker für Plaquestabilität/-instabilität arteriosklerotischer Plaques an der <i>A. brachiocephalica</i>	

Abkürzungsverzeichnis

apoE	Apolipoprotein E
apoE-KO	Apolipoprotein E-Knockout-Maus
apoE/uPA-DKO	Apolipoprotein E und Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Doppelknockout-Maus
DKO	Doppelknockout
ECM	Extrazellulärmatrix (<i>extracellular matrix</i>)
HFD	Mausfutter mit hohem Fettanteil (<i>high fat diet</i>)
IDL	Lipoprotein intermediärer Dichte (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
IMT	Intima-Media-Dicke (<i>intima media thickness</i>)
KO	Knockout
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
LDLR	Rezeptor für Lipoproteine niedriger Dichte
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
oxLDL	oxidativ modifiziertes Lipoprotein niedriger Dichte
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (<i>plasminogen activator inhibitor</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pro-MMPs	Pro-Matrix-Metalloproteinasen
scuPA	einzelkettiger Urokinase-Plasminogen-Aktivator (<i>single chain urokinase plasminogen activator</i>)
Serpine	Serin-Protease-Inhibitoren
SMC	Glatte Muskelzellen (<i>smooth muscle cells</i>)
tcuPA	doppelkettiger Urokinase-Plasminogen-Aktivator (<i>two chain urokinase plasminogen activator</i>)
TF	Gewebsthrombokinase (<i>tissue factor</i>)
tPA	Gewebs-Plasminogen-Aktivator (<i>tissue plasminogen activator</i>)
TIMP	Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen (<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
uPA-KO	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Knockout-Maus
uPAR	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (<i>very low density lipoprotein</i>)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Pathogenetische Grundlagen der Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine fortschreitende Erkrankung der großen und mittleren Arterien, gekennzeichnet durch die Ansammlung von Lipiden und fibrösen Elementen in der Gefäßwand. Bereits im ersten Lebensjahrzehnt bilden sich die pathogenetischen Vorstufen der Arteriosklerose, die sogenannten *fatty streak lesions*, in der Aorta des Menschen. Sie bestehen aus subendothelialen Einlagerungen von Fettspeichermakrophagen, den sogenannten Schaumzellen, sowie aus Proteoglykanen und Kollagenfasern.

Im weiteren Verlauf der Erkrankung bilden sich intimale Lipidherde, die ebenfalls Schaumzellen enthalten und von einer fibrösen Kappe aus glatten Muskelzellen und Interzellulärsubstanz bedeckt sind. Diese Läsionen werden als *fibrous lesions* bezeichnet (Stary et al., 1995). Durch apoptotischen Zelltod von lipidspeichernden Zellen mit Bildung eines lipidreichen Kerns und Ausdünnung der fibrösen Kappe entsteht im Verlauf dann das Atherom als Vollbild arteriosklerotischer Erkrankungen. Im Atherom sind Cholesterinablagerungen von Schaumzellen und zahlreichen Entzündungszellen umgeben. Außerdem kann es zu Kalkeinlagerungen kommen (Lusis, 2000).

Abbildung 1 veranschaulicht das makroskopische Erscheinungsbild eines Atheroms.



Makroskopische Darstellung einer humanen arteriosklerotischen Plaque an der Karotisbifurkation

Bildquelle:

<http://www.flickr.com/photos/euthman/121061911/in/pool50303459@NOO/>

Durch Ruptur der fibrösen Kappe des auch als Plaque bezeichneten Atheroms kann es zur Plättchenaggregation und Bildung eines Thrombus kommen. Je nach Ausmaß der Lumenstenose kann es zu klinisch manifesten Ischämien mit potentiell letalen Folgen wie instabiler *Angina pectoris* oder akutem Myokardinfarkt kommen. Möglich sind aber auch klinisch stumme thrombotische Ereignisse, welche durch Organisation des thrombotischen Materials mit der Zeit ebenfalls zum Wachstum der Läsionen beitragen (Libby, 2001). Da mit der Arteriosklerose oftmals auch eine Destruktion der Media und Schwächung der Gefäßwand einhergeht, kann es auch zur Aneurysmabildung – vor allem in der abdominalen Aorta – kommen (Folkesson et al., 2011).

Für die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen sind unter anderem die Spiegel an zirkulierendem *low-density-lipoprotein* (LDL)-Cholesterin von Bedeutung. Da ein Gleichgewicht zwischen der LDL-Diffusion in die Gefäßwand und seiner Entfernung aus der Gefäßwand besteht, begünstigen hohe Spiegel von LDL-Cholesterin im Plasma die Bildung subintimaler Fettdepots (Lusis, 2000). Auch eine gestörte Funktion der Endothelzellen, ausgelöst durch verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren, mit Verlust der Barrierefunktion kann zu verstärkter Deposition von Cholesterin in die Gefäßwand führen. Die Endotheldysfunktion begünstigt die Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere Makrophagen, in die Gefäßwand, welche dort modifiziertes Cholesterin aufnehmen und speichern und so zur Entstehung von vulnerablen Plaques beitragen (Eriksson, 2004).

Die Funktionalität der Endothelzellen ist abhängig von ihrer Lokalisation im Gefäßbaum: bei gleichförmigem und laminarem Blutstrom sind die Endothelzellen ellipsoid und gerade entlang der Gefäßwand ausgerichtet. Ist der Blutstrom dagegen turbulent, wie zum Beispiel in der Umgebung von Gefäßverzweigungen, ist ihre Form polygonal und ihre Ausrichtung zufällig. Letzterer Phänotyp ist assoziiert mit einer schnelleren Progression der Arteriosklerose durch höhere Permeabilität für LDL-Cholesterin (Gimbrone, 1999 und de Nigris et al., 2003). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Regionen in der Nähe von Gefäßverzwei-

gungen und damit niedriger Schubspannung (*shear stress*) Prädilektionsstellen für die Entwicklung der Arteriosklerose sind (Ku et al., 1985).

In der Gefäßwand abgelagertes LDL-Cholesterin wird zumeist oxidativ modifiziert. Oxidiertes LDL (oxLDL) führt in der Folge zu Entzündungsprozessen, die in hohem Maße am Fortschreiten der Arteriosklerose beteiligt sind. So werden Endothelzellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle stimuliert. Die Expression von Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP 1) wird in Endothelzellen gesteigert, die Expression von Gewebsinhibitoren von Matrixmetalloproteinasen (*tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP1*) wird durch oxLDL gehemmt und so die Degradation der Extrazellulärmatrix (*extracellular matrix, ECM*) begünstigt (Huang et al., 2001). In der Folge migrieren Monozyten und Lymphozyten im Rahmen des inflammatorischen Prozesses in die Arterienwand. Makrophagen können oxidiertes LDL über den Scavenger-Rezeptor, welcher seinen Namen der Tatsache verdankt, dass er eine Vielzahl an Polyanionen binden kann (Brown et al., 1980), phagozytieren und werden so zu Schaumzellen (Fogelman et al., 1988). Oxidiertes LDL kann auch die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in der Gefäßwand hemmen. NO ist ein wichtiger Vasodilatator und damit gefäßprotektiver Faktor. Die Synthese von Stickstoffmonoxid ist ein Maß für die physiologische Endothelfunktion. Zusätzlich hat Stickstoffmonoxid auch noch direkte anti-inflammatorische und antithrombotische Effekte (De Caterina et al., 1995).

Die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aus Makrophagen und T-Lymphozyten gesteuert. Die glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells, SMC*) der fibrösen Kappe produzieren und sezernieren extrazelluläre Matrixproteine (ECM-Proteine) und tragen somit einerseits zum Größenwachstum einer arteriosklerotischen Läsion, andererseits aber auch zu deren Stabilität bei (Clarke et al., 2006). Das Auftreten thrombotischer Komplikationen fortgeschrittener Plaques hängt insgesamt weniger von dem Grad der Stenose, dafür aber stark von der Zusammensetzung der Plaque ab. Vergleichende pathologische Untersuchungen haben ergeben, dass instabile

Plaques vorwiegend dünne, kollagenarme fibröse Kappen und mehr Entzündungszellen enthalten (Mann und Davies, 1996), während stabile Plaques durch einen hohen fibrösen Anteil und niedrigen Lipidanteil gekennzeichnet sind (Stary et al., 1995).

Bei der Entstehung instabiler arteriosklerotischer Plaques hemmen von T-Lymphozyten sezernierte Faktoren, wie Interferon- γ , die Synthese extrazellulärer Matrix-Proteine in glatten Muskelzellen. Makrophagen und Endothelzellen produzieren Proteasen, welche die von SMCs produzierten Matrixproteine vermehrt abbauen (Libby, 1999). Insbesondere Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) degradieren Kollagenfibrillen und schwächen so die Stärke der fibrösen Kappe (Sukhova et al., 1999). Die Expression von Matrix-Metalloproteinasen wird durch proinflammatorische Zytokine induziert.

Nach Ruptur der fibrösen Kappe binden Thrombozyten über spezifische Integrinrezeptoren an freigelegte Matrixmoleküle (z.B. Kollagen) oder immobilisierten von-Willebrand-Faktor und werden dadurch aktiviert. Darüber hinaus aktiviert die von Endothelzellen und Makrophagen produzierte Gewebsthrombokinase (*tissue factor*, TF) die Gerinnungskaskade. Oxidiertes LDL oder Bindung des von aktivierten T-Lymphozyten produzierten CD40-Liganden an das Membranprotein CD40 auf der Oberfläche von SMCs stimulieren die Synthese von TF (Schönbeck et al., 2000).

Gegenregulatorisch wird von aktivierten Endothelzellen in räumlicher Nähe zu frischen Blutgerinnseln Gewebs-Plasminogen-Aktivator (*tissue plasminogen activator*, tPA) sezerniert, welcher nach Bindung an Fibrin aus dem Thrombus die lokale Fibrinolyse vermittelt (Gebbink, 2009). Ist das lokale Gleichgewicht zwischen gerinnungsfördernden und fibrinolytischen Substanzen ungünstig verschoben, kann es durch die Ruptur der fibrösen Kappe zum kompletten Gefäßverschluss mit dem klinischen Erscheinungsbild des akuten Koronarsyndroms kommen, falls dieser Gefäßverschluss in den Herzkranzgefäßen stattfindet.

Bei nicht-tödlichem Verlauf eines thrombotischen Verschlusses einer Koronararterie werden Thromben auf arteriosklerotischen Plaques nach einiger Zeit organisiert und resorbiert. Aus aktivierten Blutplättchen werden Wachstumsfaktoren freigesetzt (wie z.B. *platelet derived growth factor*; PDGF; oder *transforming growth factor β* ; TGF- β), welche die Kollagensynthese und die Proliferation glatter Muskelzellen stimulieren. So können auch klinisch stumme thrombotische Ereignisse zum Wachstum der Läsionen führen (Libby, 2001). **Abbildung 2** veranschaulicht die Initiation, Progression und möglichen Komplikationen einer arteriosklerotischen Plaque.

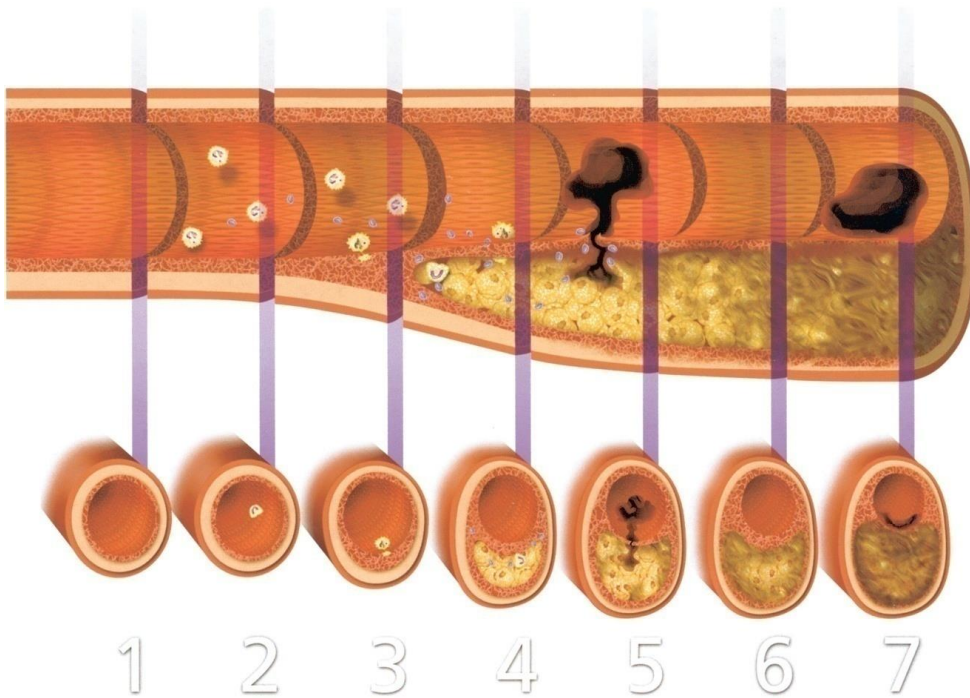


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Initiation, Progression und Komplikation arteriosklerotischer Plaques

Der obere Teil der Abbildung stellt einen Longitudinalschnitt durch eine Arterie als zeitlichen Verlauf der Arteriogenese vom Normalbefund (1) bis hin zur intramuralen Lipideinlagerung (3 und 4), akuten Thrombose (5) und chronischen Lumenstenose (7) dar. Die untere Abbildung zeigt Querschnitte der Arterie entsprechend den einzelnen Stadien der Atheromentstehung.

Bildquelle: Armstrong et al., 2006, Seite e73.

Der Prozess der Bildung arteriosklerotischer Läsionen kann, pathogenetisch betrachtet, als Antwort auf eine externe Verletzung verstanden werden (Lusis, 2000).

1.2 Das Apolipoprotein-E-Knockout-Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenese arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen

Verschiedene Tiermodelle sind zur Untersuchung der Pathogenese der Arteriosklerose entwickelt worden. In diesem Zusammenhang bietet sich die Untersuchung von Mäusen an, da diese relativ leicht zu halten und schnell zu züchten sind (Hofker et al., 1998). Obwohl Wildtyp-Mäuse spontan keine arteriosklerotischen Läsionen entwickeln, da sie durch ein Lipoprotein-Profil geschützt sind, in dem das anti-atherogene HDL überwiegt (Hofker et al., 1998), stehen mittlerweile verschiedene Mausmodelle zur Verfügung, an denen die Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen verfolgt werden kann. Alle diese Mauslinien entwickeln eine Hypercholesterinämie, die mit der Progression der Arteriosklerose korreliert.

So entwickelt beispielsweise die C57BL/6-Mauslinie unter Fett- und cholesterinreicher Diät frühe arteriosklerotische *fatty-streak*-Läsionen (Paigen et al., 1985). Die HuBTg-Maus exprimiert das menschliche apoB-Gen, welches als einziger Protein-Bestandteil von LDL-Partikeln die Aufnahme dieser Partikel in die Zellen durch den LDL-Rezeptor vermittelt (Callow et al., 1995; Purcell-Huynh et al., 1995).

Die LDL-Rezeptor-Knockout-Maus entwickelt erst unter fett- und cholesterinreicher Diät hohe Cholesterinspiegel (>1500 mg/dl), was vor allem auf erhöhte LDL- und IDL-Werte zurückzuführen ist (Ishibashi et al., 1994; Palinski et al., 1995).

Die apoE-Leiden-transgene Maus exprimiert eine apoE-Variante, die auch bei der Typ-III-Hyperlipoproteinämie des Menschen auftritt und dort ebenfalls mit Arteriosklerose assoziiert ist (van Vlijmen et al., 1994).

Die Apolipoprotein-E (apoE)-Knockout-Maus entwickelt unter Standardfutter arteriosklerotische Läsionen, die menschlichen in fast allen Stadien ihrer Entwicklung ähneln (Nakashima et al., 1994). Insbesondere ist hervorzuheben, dass von den genannten Modellen nur die apoE-Knockout-Maus im Laufe ihrer normalen Lebensspanne arteriosklerotische Läsionen entwickelt, während alle anderen Modelle dazu eine primär fett- und cholesterinreiche Diät benötigen.

Die Entwicklung der ApoE-Knockout-Maus geschah unabhängig voneinander in drei verschiedenen Laboratorien (Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992; Van Ree et al., 1994). Die apoE-Knockout-Maus ist ein geeignetes Modell zur Erforschung der Pathomechanismen der Arteriosklerose. Auf Grund des genetischen Defektes entwickeln die Mäuse eine Hypercholesterinämie (Plump et al., 1992), deren Schweregrad abhängig ist vom Cholesteringehalt der Nahrung (Nakashima et al., 1994). Interessanterweise scheinen weibliche Mäuse empfänglicher für die Hypercholesterinämie zu sein (Van Ree et al., 1994).

Apolipoprotein E (apoE) ist ein Oberflächenbestandteil von Lipoproteinen intermediärer Dichte (*intermediate density lipoproteins*; IDL). Es wird von LDL-Rezeptoren erkannt und vermittelt so die Internalisierung von Cholesterin und Phospholipiden (Breslow, 1996). Es ist auch ein wichtiger Bestandteil von Chylomikronen und Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (*very low density lipoprotein*; VLDL) und vermittelt die rezeptorvermittelte Aufnahme dieser Partikel in Hepatozyten (Hofker et al., 1998). Außerdem wird apoE von Makrophagen sezerniert und inhibiert die Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen (Lusis, 2000).

Beim Menschen ist das apoE-Gen auf Chromosom 19 lokalisiert, bei der Maus auf Chromosom 7 (NCBI Gene Database, 2012).

Das humane Apolipoprotein E-Gen ist Teil eines funktionellen Genclusters, bestehend aus insgesamt 4 Apolipoprotein-Genen: dem apoE-Gen, dem apoC1-Gen, dem apoC2-Gen und dem apoC4-Gen. Diese vier Apolipoprotein-Gene sind evolutionär miteinander verwandt (Li et al., 1988; Allan et al., 1995).

Für das humane apoE-Gen wurden ein Polymorphismus mit den allelischen Varianten apoE ϵ 2, ϵ 3 und ϵ 4 beschrieben. ApoE ϵ 3 ist mit einer Allel-Frequenz von 0,77 die häufigste Isoform (De Knijff und Havekes, 1996). Diese Gene kodieren für die entsprechenden Plasmaproteine apoE 2, apoE 3 und apoE 4, welche ko-dominant im Plasma vorkommen können (Davignon et al., 1988). Der Polymorphismus im Apolipoprotein E-Gen war und ist häufig Gegenstand epidemiologischer Studien. So scheint es Assoziationen mit der Entstehung von M. Alzheimer (Yildiz et al., 2012), Multipler Sklerose (Yin et al., 2012), Gallenblasensteinen (Xue et al., 2012) und Arteriosklerose zu geben. In Bezug auf letztere konnte in Untersuchungen an Menschen eine Assoziation des Genotyps ϵ 4 mit erhöhten Cholesterinspiegeln sowie einem vermehrten Auftreten koronarer Herzerkrankung gezeigt werden, während der Genotyp ϵ 2 mit einem verringerten Risiko für koronare Herzerkrankung und niedrigen LDL-Plasmaspiegeln assoziiert war (Bennett et al., 2007; Song et al., 2004). Unter anderem löst die apoE ϵ 3-Variante, eine Tandem-Duplikation von 7 Aminosäuren, die menschliche Hyperlipoproteinämie Typ III aus, die auf einer verminderten Ausscheidung von Chylomikronen und VLDL beruht und mit einer frühen Arteriosklerose assoziiert ist (Van den Maagdenberg et. al., 1989; Wardell et. al., 1989; Georgiadou et al. 2011).

Besonders stark sind die Chylomikronen und VLDL-Lipoproteine im Plasma der apoE-Knockout-Mäuse erhöht. Die Cholesterinspiegel liegen bei Standardfütterung bei 400-600 mg/dl und steigen unter fett- und cholesterinreicher Diät auf bis zu 1500-2000 mg/dl an (Plump et al., 1992). Die Hypercholesterinämie apoE-defizitärer Mäuse ist somit stärker ausgeprägt als bei apoE-defizitären Menschen, wobei ein vollständiges Fehlen von Apolipoprotein E im Plasma beim Menschen bisher nur in Einzelfällen beschrieben wurde und dann in einer Hyperlipidämie Typ III resultiert (Ghiselli et al., 1981). Die Triglyzeridspiegel im Blut der apoE-Knockout-Mäuse sind dagegen erniedrigt; besonders der Triglyzeridanteil der VLDL-Partikel (Hofker et al., 1998), was vermutlich auf eine vermehrte Lipolyse zurückzuführen ist, da apoE die Lipolyse *in vivo* und *in vitro* inhibiert (Rensen und van Berkel, 1996).

ApoE-Knockout-Mäuse entwickeln Gefäßläsionen, die denen der menschlichen Arteriosklerose ähneln, wobei alle Entstehungsstadien von der Monozytenadhäsion bis zur fibrösen Plaque nachgewiesen werden können (Nakashima et al., 1994; Hofker et al., 1998). Ein weiterer Vorteil des apoE-Knockout-Mausmodells ist, dass die Läsionen sich zu fibrösen Plaques weiterentwickeln (Breslow, 1996), wobei komplizierte Plaques oder Rupturen im Gegensatz zur humanen Erkrankung bei der Maus eher selten auftreten. Nichtsdestotrotz ist die ApoE-Knockout-Maus das am häufigsten verwendete Mausmodell in der Arterioskleroseforschung (Zaragoza et al., 2011).

Prädilektionsstellen für die Entstehung der Arteriosklerose der apoE-Knockout-Maus sind die Aortenwurzel, die Carotisbifurkation, die proximalen Koronararterien sowie die *A. brachiocephalica* (Breslow, 1996). Die Plaquebildung beginnt im Alter von 5 Wochen mit der Monozytenadhäsion an das Endothel. *Fatty streak*-Läsionen entstehen im Alter von 10 Wochen, *intermediate lesions*, bestehend aus glatten Muskelzellen und Schaumzellen, im Alter von 15 Wochen sowie fibröse Plaques nach rund 20 Wochen. In älteren Mäusen kommt es zur Entstehung von fortgeschrittenen, komplexen Läsionen mit Kalzifizierungen des fibrösen Gewebes oder Zerstörung der Media und Aneurysmabildung (Breslow, 1996). Komplizierte Läsionen mit Thrombose können dabei spontan jedoch nur selten beobachtet werden, wenn, dann entstehen sie am ehesten in der Prädilektionsstelle *A. brachiocephalica* (Zaragoza et al., 2011). Hier können bei mit fettreicher Kost gefütterten Mäusen morphologische Kriterien erhoben werden, welche bei Menschen für ein hohes klinisches Risiko stehen: Plaqueruptur, wandständige Thromben, Erythrozyten oder Einblutungen in die Plaque (Bond und Jackson, 2011). Rupturen treten am häufigsten in den proximalen 150 µm der *A. brachiocephalica* auf (Jackson 2007) und sind selten länger als 60 µm (Jackson et al, 2007). Im Gegensatz zum Menschen zeigen die Koronararterien, welche bei Mäusen vollständig intramyokardial verlaufen, typischerweise keine instabilen und rupturierten Plaques, sondern häufig stenosierende arteriosklerotische Plaques bis hin zum vollständigen Gefäßverschluss (Williams et al., 2002). Eine

ischämische Kardiomyopathie lässt sich nur selten und in älteren Mäusen nachweisen (Nakashima et al., 1994).

Durch eine artefiziell erzeugte Endothelverletzung ist es möglich, im Tiermodell die Entstehung sowie die Ruptur von Plaques an definierten Stellen zu induzieren. Hierbei wird sich zunutze gemacht, dass Plaques in Gefäßen als Antwort auf eine Verletzung (*response to injury*) im Rahmen des vaskulären Remodellings entstehen (Ross, 1999).

Ein frühes Beispiel in der Entwicklung von Tiermodellen ist die Ballonkatheter-Verletzung. Hierbei wurden Ballonkatheter in die thorakale Aorta von cholesterinreich gefütterten Kaninchen implantiert und für 1 Monat belassen, was zu Plaquebildung in Bereich des Ballons führte. Durch Aufblasen des Ballons wurden dann die Plaqueruptur und aufsitzende Thrombose induziert (Rekhter et al., 1998). In einem weiteren Modell wurde durch den Druck einer Gefäßklemme der Endothelschaden in der Aorta von apoE-KO-Mäusen mechanisch induziert (Reddick et al., 1998). Einen ebenfalls mechanischen Endothelschaden induzierte eine Arbeitsgruppe mittels Insertion einer mikrochirurgischen Nadel in bereits geformte Plaques der Carotisbifurkation von apoE-KO-Mäusen, was regelhaft zu induzierten Rupturen der präformierten Plaques führte (Bentzon et al., 2007). Auch nach Induktion eines Thrombus kann eine intraluminale Plaquebildung beobachtet werden. Wird eine Verlangsamung des Blutflusses durch Platzierung einer verengenden Gefäßmanschette in der A. carotis von apoE- und LDL-Rezeptor (LDLR)-Doppelknockout-Mäusen induziert, entstehen intimale Plaques (von der Thüsen et al., 2001). In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell wird ein chemischer Endothelschaden, gefolgt von Plättchenaggregation und Thrombose, durch die Applikation von Eisenchlorid induziert (Konstantinides et al., 2001; Schäfer et al., 2002).

1.3 Die Bedeutung des Plasmin-/ Plasminogen-Systems für die Pathophysiologie der Arteriosklerose

Das Plasmin-/ Plasminogen-System wird im Rahmen von Gefäßverletzungen sowie im Rahmen von Thrombusbildung physiologischerweise im Körper aktiviert. Der Abbau von Fibrin, z.B. bei der Auflösung von Thromben auf rupturierten arteriosklerotischen Läsionen, erfolgt durch die Protease Plasmin, welche zuvor aus ihrer inaktiven Vorstufe aktiviert werden muss. Plasminogen kann durch so genannte Serin-Proteasen zu Plasmin aktiviert werden. Hierzu zählen der Gewebs-Plasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*; tPA) sowie der Urokinase-Plasminogen-Aktivator. Neben der Degradation von Fibrin aktiviert Plasmin aber auch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), eine Gruppe von Enzymen, die ihrerseits extrazelluläre Matrixproteine degradieren (Lijnen, 1999).

Als Inhibitoren des Plasmin/Plasminogen-Systems treten sowohl Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (*plasminogen activator inhibitors*; PAI), α 2-Antiplasmin sowie Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen (*tissue inhibitors of Metalloproteinases*; TIMP) in Erscheinung, die allesamt zur Superfamilie der Serpine (Serin-Protease-Inhibitoren; *serine proteinase inhibitors*) zusammengefasst werden (Collen, 2001).

Abbildung 3 veranschaulicht schematisch den Aufbau des Plasmin-/ Plasminogensystems.

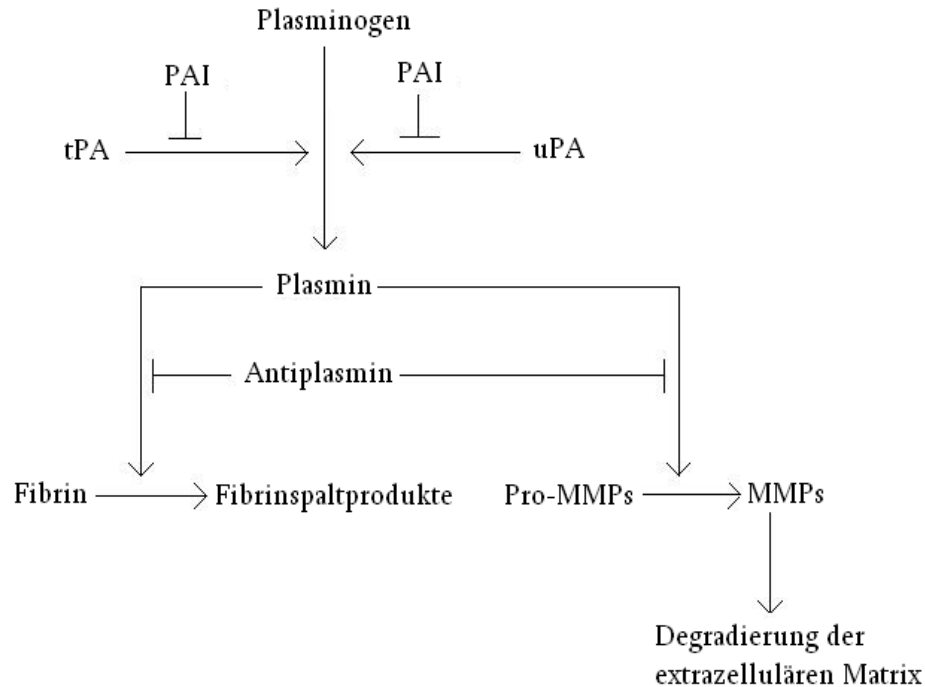


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Plasmin-/ Plasminogen-Systems

Die Pfeile weisen dabei auf eine Stimulierung sowie die Plateaus auf eine Inhibition des jeweiligen Stoffwechselforgangs hin. Abkürzungen: tPA = Gewebs-Plasminogen-Aktivator; PAI = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor; uPA = Urokinase-Plasminogen-Aktivator; Pro-MMPs = Pro-Matrix-Metalloproteinasen; MMPs = Matrix-Metalloproteinasen

Aufgrund der Expression von tPA vorwiegend in Endothelzellen im Gegensatz zu der ubiquitären Expression von uPA in den Zellen der Gefäßwand (also auch in Fibrozyten, SMCs, Endothelzellen) geht man davon aus, dass tPA vorwiegend die Homöostase des Fibrins vermittelt, während uPA für den physiologischen Ablauf der Fibrinolyse nur eine geringe Bedeutung zu haben scheint und vor allem an der Regulation von Zell-Migration und anderen Gewebeumbauprozessen be-

eteiligt ist (Collen, 2001). Das Plasminogen-System spielt somit bei den physiologischen Prozessen der Fibrinhomeostase und des Gefäßremodellings eine bedeutende Rolle. Aber auch pathologische Prozesse, wie die Arteriosklerose, Neointimabildung, Myokardischämie, Angiogenese, Tumorwachstum und -metastasierung, Wundheilung und Inflammation können durch Manipulation von Bestandteilen des Plasmin-/Plasminogen-Systems beeinflusst werden (Collen, 2001).

Die Expression von tPA in menschlichen arteriosklerotischen Läsionen ist verändert; so liegt tPA in der Intima und Neointima arteriosklerotischer Läsionen der menschlichen Aorta erniedrigt vor, in der Media aber liegt tPA, assoziiert mit glatten Muskelzellen, vermehrt vor (Padró et al., 1995).

Aus Mangel an tPA resultiert eine unzureichende fibrinolytische Reaktion (Lijnen et al., 1989), während bei Erkrankungen wie venösen Thromboembolien, Adipositas, Sepsis und koronarer Herzerkrankung die PAI-1-Konzentration im Plasma erhöht ist (Collen, 2001).

In menschlichen arteriosklerotischen Läsionen wurden erhöhte Konzentrationen von PAI-1 nachgewiesen (Schneiderman et al., 1992; Lupu et al., 1993; Chomiki et al., 1994).

Der Serin-Protease-Inhibitor Serp-1, ein virales Protein, das unter anderem Plasmin, uPA und tPA hemmt, vermindert die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen und induziert bei apoE-KO-Mäusen einen stabilen Plaque-Phänotyp (Bot et al., 2003).

Bei Plasminogen-Knockoutmäusen wurde eine verstärkte Arteriosklerose nachgewiesen (Schneiderman et al., 1992).

1.4 Die pathophysiologische Bedeutung des Urokinase-Plasminogen-Aktivators im Rahmen der Arteriosklerose

Urokinase-Plasminogen-Aktivator katalysiert die Konversion von Plasminogen in die aktive Protease Plasmin, welche die Degradation von Fibrin und damit eine Auflösung von thrombogenem Material bewirkt. Der Name Urokinase-Plasminogen-Aktivator ist darauf zurückzuführen, dass das Molekül in hoher Konzentration im menschlichen Harntrakt und Urin (40-80 ng/ml) vorkommt (Stump et al., 1986).

Das für den Urokinase-Plasminogen-Aktivator kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 10 (q24) und enthält 11 Exons (Tripputi et. al., 1985). UPA ist ein Glykoprotein, das aus 411 Aminosäuren besteht. Sezerniert wird das einkettige Molekül (*single chain uPA*; scuPA), welches durch Plasmin mittels Spaltung der Lysin¹⁵⁸-Isoleucin¹⁵⁹-Bindung in zweikettiges (*two chain uPA*; tcuPA) überführt werden kann (Lijnen et al, 1987).

Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator besteht aus 3 Domänen (Collen, 2001):

1. der epidermalen Wachstumsfaktor-Domäne (der NH₂-Terminus), die die Bindung an den spezifischen uPA-Rezeptor vermittelt
2. der Kringel-Domäne
3. der Protease-Domäne (der COOH-Terminus), die die katalytische Triade enthält, die allen Serinproteasen des Plasminogen-Systems gemeinsam ist und aus Serin, Asparagin und Histidin besteht.

UPA wird durch Fibroblasten, Endothelzellen sowie Monozyten bzw. Makrophagen synthetisiert und sezerniert (Larsson et al., 1984, Grau und Moroz, 1989). Die Plasmakonzentration liegt bei 2-4 ng/ml; die Halbwertszeit beträgt 5-7 Minuten (Darras et al., 1986). Obwohl die Synthese von uPA durch verschiedene Botenstoffe beeinflusst wird (Nagamine et al., 1983; Pearson et al., 1987; Ziegler et al., 1990), unterliegt der Plasmaspiegel keiner zirkadianen Rhythmik.

UPA vermittelt Proteolyse, Chemotaxis, induziert Zelladhäsion sowie Zelldeadhäsion und vermag über das Zusammenspiel mit G-Proteinen sowie anderen, bisher nur postulierten, Rezeptoren die Genexpression zu aktivieren. Die uPA vermittelte Proteolyse bewirkt neben dem Fibrinabbau eine Degradation der extrazellulären Matrix und moduliert die Zellmigration während des Gewebsneuaufbaus (Chapman, 1997; Binder et al., 2007). So ist uPA an der Migration von Makrophagen und an deren Umwandlung zu Schaumzellen von Bedeutung (Fuhrman, 2012). Auch für das Wachstum und die Migration von Krebszellen ist uPA wichtig. So zeigen uPA-Knockout-Mäuse ein verzögertes Fibrosarkomwachstum, mit niedrigeren Proliferations- und höheren Apoptose-Indices (Cullen P et al. 2003).

UPA kann an drei verschiedene Rezeptoren binden. Der uPA-Rezeptor (uPAR) wird auf der Oberfläche von glatten Muskelzellen (Clowes et al., 1990), Monozyten (Vassalli et al., 1985), Thrombozyten (Piguet et al., 1999) und Endothelzellen (Pepper et al., 1987) exprimiert. Der uPAR verstärkt die uPA-vermittelte Aktivierung von Plasminogen und bewirkt eine lokale Aktivierung von Plasminogen in der direkten Umgebung der Rezeptor-tragenden Zellen (Ellis und Dano, 1991). Dies trägt zur Degradation extrazellulärer Matrix-Proteine wie z.B. Kollagen bei und ermöglicht so die Zellmigration und z.B. das Einwandern von SMCs in die Neointima (Carmeliet et al., 1998). Ein Kennzeichen migrierender Zellen ist die erhöhte Expression von uPA und uPAR. Der uPA-Rezeptor ist dabei am führenden Ende der migrierenden Zelle lokalisiert (Chapman, 1997) und vermittelt die Anlagerung von migrierenden Zellen an Matrixproteine (Deng et al., 2001, Alfano et al., 2005).

Über die unspezifischen Rezeptoren, wie dem Asiaglykoproteinrezeptor auf Hepatozyten und dem LRP/ α_2 -Makroglobulin-Rezeptor auf Makrophagen, wird uPA aus dem Blut entfernt (Conese et al., 1995; Van der Kaaden et al., 1995).

Der Beitrag von uPA zur Arteriosklerose ist umstritten, da Studien an Tiermodellen widersprüchliche Ergebnisse zeigen. Einige Forschergruppen unterstützen

mit ihren Ergebnissen die Theorie, dass eine Überexpression von uPA die Arteriosklerose beschleunigt (Falkenberg et al., 2002; Cozen et al., 2004). UPA vermag jedoch ebenfalls eine frühe Auflösung einer intraluminalen oder intramuralen Thrombose zu bewirken sowie wichtige Zellmatrixbestandteile zu entfernen, was wiederum ein vaskuläres Remodelling bewirken kann (Loskutoff et al., 2000).

Eine erhöhte Konzentration von uPA konnte in der Neointima, glatten Muskelzellen sowie Makrophagen arteriosklerotischer Läsionen der menschlichen Aorta nachgewiesen werden (Lupu et al., 1995; Padró et al., 1995) und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (Padró et al., 1995; Kienast et al., 1998). Auch das Auftreten einer Restenose der Koronararterien nach einer perkutanen transluminalen Coronarangioplastie (PTCA) korreliert positiv mit den Plasmaspiegeln von uPA und PAI-1 (Strauss et al., 1999).

UPA-Knockout-Mäuse sind phänotypisch unauffällig und weisen eine normale Lebensspanne auf (Collen, 2001). Nach Gefäßverletzung ist die Aktivität von uPA in der Gefäßwand bei Mäusen (Schäfer et al., 2002) und Ratten (Clowes et al., 1990; Reidy et al., 1996) signifikant erhöht; zur gleichen Zeit wird die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen erhöht (Carmeliet und Collen, 1998a). Vermutlich trägt uPA als fibrinolytische Serinprotease ebenfalls zur der Organisation von thrombotischem Material, das im Verlauf arteriosklerotischer Plaquebildung entsteht und organisiert wird, bei (Loskutoff et al., 2000).

Ein Mangel an uPA ist ebenfalls von Bedeutung für die langfristige Prognose von Thrombosen. Wird beispielsweise bei Mäusen experimentell eine Thrombose der unteren Hohlvene erzeugt, gelingt die Thrombusauflösung und -organisation bei Fehlen von uPA deutlich verzögert, transplantiert man uPA-Knockoutmäuse mit Wildtyp-Knochenmark, wird dadurch die Thrombusgröße signifikant reduziert (Singh et al., 2003). UPA-Knockout- und Plasminogen-Knockout-Mäuse, bei denen durch Ligatur einer Koronararterie ein Herzinfarkt erzeugt wird, zeigen im Gegensatz zu Wildtyp- und tPA-Knockout-Mäusen eine deutlich geringere Infil-

ration des ischämischen Myokards mit Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (Creemers et al., 2000). Außerdem sind sie, vermutlich auf Grund einer geringeren fibrinolytischen Aktivität, vor einer Ventrikelruptur geschützt (Carmeliet und Collen, 1998a). Die proteolytische Aktivität von uPA und Plasmin ist bei der Infarktheilung sowie bei Tumoren für die Endothelmigration und damit die Neoangiogenese von entscheidender Bedeutung (Glass und Witztum, 2001). Auch wenn für uPA sowie tPA funktionelle Schwerpunkte in der vaskulären Physiologie beschrieben wurden, scheint doch eine funktionelle Überschneidung zu bestehen. So sind sowohl tPA- als auch uPA-KO-Mäuse lebensfähig und erreichen ein den Wildtypen vergleichbares Alter. Wenn aber beide Plasminogenaktivatoren fehlen, entwickeln die tPA-uPA-DKO-Mäuse eine signifikant verkürzte Lebensspanne auf Grund von generalisierter Thrombose und Organversagen (Carmeliet et al. 1996).

In der Aorta von apoE-Knockoutmäusen verhindert das Fehlen von uPA (apoE- und uPA-Doppelknockoutmäuse; DKO) die Ausbildung von Aneurysmata sowie die Fragmentierung von extrazellulärer Matrix und elastischen Laminae der Media. Der Schweregrad der Arteriosklerose scheint dabei durch das Fehlen von uPA allerdings nicht verändert zu werden (Preissner et al., 1999).

Übereinstimmende Ergebnisse wurden in Bezug auf die glatten Muskelzellen erzielt. Sowohl das Fehlen des uPA-Gens als auch des Plasminogen-Gen bei Mäusen resultierte in einem verminderten Gehalt der Neointima an glatten Muskelzellen (Carmeliet et al., 1997a und c). Ein Einfluss auf die Größe der Neointimabildung ist bisher nicht belegt.

Bei Kaninchen führte eine durch adenovirale Vektoren induzierte 1 bis 2-wöchige erhöhte uPA-Expression in der *A. carotis* zur gleichzeitigen Vasokonstriktion sowie nach einem Intervall von 4 Wochen zur signifikanten Erhöhung der Neointimafläche und signifikanten Lumenverkleinerung sowie zu Degradation der elastischen Lamina (Falkenberg et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Vielzahl von Studien auf eine Beteiligung des Plasmin-/ Plasminogen-Systems an der Pathogenese der Arteriosklerose hindeuten. Da diese Daten zur Rolle des Plasmin-/ Plasminogen-Systems in der Pathogenese der Arteriosklerose zum Teil widersprüchlich sind, ist die exakte Rolle des Plasmin-/ Plasminogen-Systems an der Entstehung von Arteriosklerose bislang unklar.

1.5 Ziele der Arbeit

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht genau bekannt, welche Rolle Urokinase-Plasminogen-Aktivator im Rahmen der Arteriosklerose zukommt und inwieweit physiologische bzw. pathophysiologische Konzentrationen dieser Protease die Plaquezusammensetzung sowie das Plaquewachstum beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Auswirkungen des Fehlens von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Zusammensetzung und das Wachstum von Gefäßläsionen bei Apolipoprotein-E-Knockout-Mäusen, ein etabliertes Tiermodell der Arteriosklerose, untersucht.

Dabei wurden Apolipoprotein E-defiziente Mäuse (apoE-KO) mit uPA-Gen-defizienten Mäusen (uPA-KO) zu Doppelknockoutmäusen (apoE/uPA-DKO) gekreuzt, um systematisch den Einfluss von uPA auf die Größe, zelluläre Zusammensetzung und Stabilität arteriosklerotischer Plaques zu untersuchen.

In der ersten Serie von Experimenten wurden experimentell induzierte Gefäßläsionen an der *A. carotis* analysiert, während im zweiten Untersuchungsabschnitt spontan entstandene arteriosklerotische Plaques der Aortenwurzel, den Koronararterien sowie der *A. brachiocephalica* untersucht wurden. Neben der Größe der Läsionen und der durch sie verursachten Lumenstenosierung wurde dabei insbesondere die Zellularität, der Gehalt an glatten Muskelzellen, Kollagen sowie Fibrinogen-/Fibrin der arteriellen Gefäßläsionen histologisch bzw. immunhistochemisch analysiert und morphometrisch quantifiziert.

Da Plaqueruptur und -thrombose wichtige Determinanten in Bezug auf den klinischen Verlauf der menschlichen Arteriosklerose darstellen, widmete sich ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit direkten und indirekten histologischen Charakteristika der Plaquevulnerabilität und -ruptur in der Gegenwart und Abwesenheit von Urokinase-Plasminogen-Aktivator.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Haltungs- und Versuchsbedingungen der Tiere wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit sowie der Tierversuchskommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt und entsprachen, von ihren Grundsätzen her, den nationalen Richtlinien für die Aufzucht und Pflege von Versuchstieren. Die apoE-KO (stock #002052) und uPA-/- (stock #002509) Mäuse stammen aus den *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, ME, USA). Die Doppelknockoutmäuse (DKO) (apoE-KO uPA-/-) wurden durch Kreuzung von apoE-KO mit uPA-/- Mäusen hergestellt.

Laut Angaben des Züchters waren apoE-KO Mäuse über einen Zeitraum von 12 Generationen und uPA-KO Mäuse über einen Zeitraum von 8 Generationen in den genetischen C57Bl/6J Hintergrund zurückgekreuzt worden.

2.1.1 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der Nachkommen wurde genomische DNA mit Hilfe des „DNeasy Blood and Tissue Kits“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert.

Hierbei wurde zunächst eine Biopsie des Mäuseschwanzes von ca. 0,5 cm Länge entnommen und mit 180 µl ATL-Puffer sowie Proteinase K versetzt. Diese Mischung wurde für 8 Stunden bei 55 °C inkubiert, bis die Lyse des Gewebes kom-

plett war, und anschließend mit 400 µl AL-Puffer vermischt. Das Entfernen von Protein und Fetten aus der Suspension erfolgte durch dreimaliges Zentrifugieren des lysierten Gewebes mit verschiedenen Puffern (AW 1 und AW 2) aus dem obengenannten Kit mit Verwerfen des Überstandes. Anschließend wurde die bereits aufgereinigte DNA mit AE-Puffer eluiert.

Anschließend wurde der Genotyp mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)- gemäß den folgenden Protokollen der *Jackson Laboratories*- bestimmt.

PCR zum Nachweis des uPA-Gens:

- Reaktionsbestandteile:

ddH ₂ O		1,3 µl
10fach PE-Puffer II		5 µl
25 mM MgCl ₂		4 µl
2 mM dNTP	Nukleosidtriphosphate	5 µl
20 µM oIMR 162	Neomycin-Primer (Vorwärtsprimer)	2 µl
20 µM oIMR 163	Neomycin-Primer (Rückwärtsprimer)	2 µl
20 µM oIMR 432	Plasminogen-Aktivator-Urokinase-Primer (Plau-Primer)	10 µl
20 µM oIMR 433	Plasminogen-Aktivator-Urokinase-Primer (Plau-Primer)	10 µl
5 mM <i>loading dye</i>	DNA-Färbemittel	1,7 µl
5 U/µl Taq Polymerase	Hitzebeständige Polymerase	0,7 µl
Extrahierte Maus-DNA		10 µl

- Amplifikationsprotokoll:

Schritt 1: 95 °C 2 Minuten

Schritt 2: 95 °C 1 Minute

Schritt 3: 60 °C 1 Minute

Schritt 4: 72 °C 1 Minute

Wiederholen von Schritt 2 bis 4 (insgesamt 30 Durchläufe)

Schritt 5: 72 °C 10 Minuten

Schritt 6: Auf 10 °C abkühlen und Temperatur halten

Mit den spezifischen Primern oIMR 432 und 433 wird ein 153 Basenpaare großes DNA-Fragment des uPA-Wildtyps amplifiziert. Mithilfe der Neomycin-Primer wird ein 337 Basenpaare großes DNA-Fragment synthetisiert, welches spezifisch für die uPA-Knockoutmäuse ist, bei welchen das uPA-Gen gentechnisch durch die sogenannte *neomycin resistance cassette* ersetzt wurde.

PCR zum Nachweis des apoE-Gens:

- Reaktionsbestandteile:

ddH ₂ O		4,26 µl
10fach AB PRC-Puffer II		1,2 µl
25 mM MgCl ₂		0,96 µl
2,5 mM dNTP		0,96 µl
20 µM oIMR 0180	Gemeinsamer Vorwärts-Primer	0,3 µl
20 µM oIMR 0181	Wildtyp-Rückwärts-Primer	0,3 µl
20 µM oIMR 0182	ApoE-KO-Rückwärts-Primer	0,3 µl
5 mM <i>loading dye</i>	DNA-Färbemittel	1,7 µl
5U/µl Taq Polymerase	Hitzebeständige Polymerase	0,06 µl
Extrahierte Maus-DNA		2,0 µl

- Amplifikationsprotokoll:

Schritt 1: 94 °C 3 Minuten

Schritt 2: 94 °C 30 Sekunden

Schritt 3: 68 °C 40 Sekunden

Schritt 4: 72 °C 1 Minute

Wiederholen von Schritt 2 bis 4 (insgesamt 35 Durchläufe)

Schritt 5: 72 °C 2 Minuten

Schritt 6: Auf 10 °C abkühlen und Temperatur halten

Zwischen den Primern oIMR 0180 und oIMR 0181 entsteht ein 115 Basenpaare großes Amplifikationsprodukt, welches den apoE-Wildtyp kennzeichnet; zwischen oIMR 0180 und oIRM 0182 entsteht das Genprodukt der apoE-KO-Maus, welches 245 Basenpaare groß ist.

Mittels Agarosegelelektrophorese (1 %-iges Gel) wurden die jeweiligen Amplifikationsprodukte getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. So konnte der Genotyp der eingeschlossenen Versuchstiere eindeutig bestimmt werden.

2.1.2 Diätetische Induktion einer Hypercholesterinämie

Alle Mäuse erhielten zunächst normales Nagetierfutter (Ssniff, Soest, Deutschland). Eine Gruppe von Mäusen wurde im Alter von 8 Wochen auf eine fettreiche Diät (*high fat diet*, HFD) mit 21 % Fett und 0,15 % Cholesterin (TD 88137; Harlan Winkelmann, Borcheln) umgestellt, während den restlichen Mäusen weiterhin reguläres Nagetierfutter (Ssniff, Soest, Deutschland) verabreicht wurde.

2.2 Induktion experimenteller Verletzungen der A. carotis mit Hilfe des Eisenchloridmodells

14-18 Wochen alte Mäuse wurden der experimentellen Verletzung der *Arteria carotis communis* nach dem Eisenchloridmodell gemäß einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll unterzogen (Konstantinides et al., 2001; Schäfer et al., 2002).

Dabei wurden die Tiere durch die Inhalation von Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden) anästhesiert. Unter Schonung des *Nervus vagus* wurde die linke *A. carotis communis* freipräpariert und angeschlungen. Eine Ultraschall-Sonde (0,5 VB; Transonic Systems), verbunden mit einem Flussmessgerät (Modell T106; Transonic Systems) und einem Datenaufzeichnungsprogramm (WinDaq; DATAQ

Instruments), wurde um die *A. carotis* platziert. Der initiale Blutfluss wurde schriftlich festgehalten. Ein 0,5 x 1,0 mm großer Filterpapierstreifen (Whatman Nr. 1) wurde in 10 %-iger Eisenchloridlösung getränkt und für exakt 3 Minuten auf der Oberfläche der *A. carotis communis* platziert. Nach dem Entfernen des Filterpapiers wurde für weitere 25 Minuten der Blutfluss beobachtet. Der Zeitpunkt des Nullflusses, der eine vollständige Thrombose kennzeichnet, oder eine abrupte Wiederherstellung des Blutflusses, als Kennzeichen einer Embolisierung, wurden notiert. Danach wurde die Sonde entfernt und die Wunde mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Mäuse verblieben bis zum Aufwachen auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte und wurden danach in ihre Käfige zurückgebracht.

Drei Wochen nach der Verletzung mit Eisenchlorid wurden die Mäuse erneut anästhesiert und Blut zur späteren laborchemischen Analyse (s.u.) der Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration aus der linken Herzkammer entnommen. Über den gleichen Zugang wurden die Mäuse mit 4 %-iger Zink-Formalin-Lösung über 5 Minuten perfundiert und die Gewebe fixiert. Das thrombotische Gefäßsegment wurde vollständig entnommen, wobei das distale Ende einschließlich der Karotidbifurkation entfernt wurde, um die Orientierung am Präparat zu ermöglichen.

2.3 Morphometrische Quantifizierung experimentell-induzierter und spontaner arteriosklerotischer Läsionen

Zur morphometrischen Auswertung der experimentell induzierten Läsionen an der *A. carotis communis* wurden jeweils 5 µm dicke Paraffinschnitte vorbereitet und mit **Verhoeff's Elastikafärbung** angefärbt. Hierfür wurden die Paraffinschnitte zunächst in Xylol und einer Alkoholreihe in absteigender Konzentration deparaffinisiert. In „Verhoeff's Elastic Stain Working Solution“, bestehend aus 10 %-igem Hämatoxylin, 100 %-igem Ethylalkohol, 10 %-iger Eisenchloridlösung und Iodlösung im gleichen Mischungsverhältnis für 15 Minuten gefärbt; dabei erfolgte die Schwarzfärbung der elastischen Fasern und der Zellkerne. Überschüssige Farbe wurde durch Waschen unter fließendem Wasser für 20 Minuten entfernt. Nach Differenzierung in 2 %-iger Eisenchloridlösung wurden die Gewebe-

schnitte in 5 %-iger Natriumthiosulfatlösung für eine Minute platziert, kurz in destilliertem Wasser gespült, dann in „van-Gieson-Lösung“ für eine Minute platziert, wodurch eine rote Anfärbung des Kollagen erzeugt wurde. Schließlich erfolgte das Entfernen anhaftenden Wassers durch Eintauchen in 95 %-igen, dann 100 %-igen Ethylalkohol sowie Xylol.

Mithilfe der Software ImagePro Plus (Media Cybernetics) erfolgte dann die morphometrische Analyse der Gewebeschnitte. Hierzu wurden die Flächen innerhalb der *Lamina elastica interna*, der *Lamina elastica externa* sowie das Restlumen vermessen und daraus die Flächen der Neointima und Media, sowie das Intima-Media-Verhältnis und der Grad der Lumenstenose berechnet. (vgl. Schäfer et al., 2002; Schäfer et al., 2003)

Dabei wurden jeweils 5 gleichmäßig verteilte Arteriensegmente im Abstand von 200 µm zueinander untersucht und die Ergebnisse für jedes Versuchstier gemittelt. Die Mittelwerte sowie die Standardabweichung wurden somit aus den Ergebnissen von 11-17 Mäusen in jeder Versuchsgruppe ermittelt.

Zur Beurteilung von spontan entwickelten arteriosklerotischen Plaques wurden apoE-Knockout sowie apoE- und uPA-Doppelknockoutmäuse mit normalem Nagetierfutter gefüttert. Im Alter von 12 Monaten wurden diese Mäuse, gemäß dem oben erwähnten Procedere, tief anästhesiert und perfusionsfixiert. Ihnen wurde die proximale Aorta mit einem Teil des linken Ventrikels, die Herzspitze, die Bifurkation der *Arteria carotis* sowie die *Arteria brachiocephalica* entnommen. Die entnommenen Gewebe wurden für weitere 4 Stunden in 4 %-iger Zinkformalinlösung aufbewahrt; danach bis zur endgültigen Paraffinfixierung in 70 %-igem Ethylalkohol gelagert.

Bezüglich der Analyse der Aortenwurzel wurden serielle 5 µm dicke Paraffinschnitte aus Richtung des linken Ventrikels bis zur Ebene der Aortenklappen geschnitten. Die arteriosklerotische Plaqueläche wurde auf den Gewebequerschnitten bestimmt, an denen alle 3 Aortenklappensegel sichtbar waren, was auf ca. 1-3 Schnitten pro untersuchter Maus der Fall war (Paigen et al., 1987; Tangirala et al., 1995). Die koronare Arteriosklerose wurde an denjenigen Abschnitten

der Aortenwurzel untersucht, auf denen die proximalen Segmente der Koronararterien sichtbar waren, was einer Anzahl von 1-2 Abschnitten pro untersuchter Maus entsprach (vgl. Calara et al., 2001).

Um die Wirkungen von uPA bzw. seiner Abwesenheit auf die Stabilität der vaskulären Läsionen zu bestimmen, wurden serielle Schnitte durch die Brachiozephalarterie ausgewertet. Dieses Gefäß wurde ausgewählt, weil es laut Literatur eine Prädilektionsstelle bezüglich Plaquevulnerabilität und -ruptur im apoE-KO-Mausmodell ist (s.o.). Um eine quantitative Bestimmung der arteriosklerotischen Läsionen der *Arteria brachiocephalica* vorzunehmen, wurden 30 µm dicke Gefäßschnitte entlang des proximalen Gefäßanteils bis zum Abgang der rechten *A. carotis communis* gewonnen und die jeweiligen arteriosklerotischen Plaques untersucht, was einer Anzahl von 3-10 Abschnitten pro Maus entsprach. Die Ergebnisse wurden anschließend gemittelt. Um den Schweregrad der luminalen Stenose zu bestimmen, wurde außerdem das freie Lumen vermessen und als Fraktion im Verhältnis zur *Lamina elastica interna* angegeben.

2.4 Histologische Analyse der Plaquezusammensetzung und der Plaquevulnerabilität

Über die quantitative Beurteilung der Neointimaläsionen hinaus wurden auch qualitative Kriterien beurteilt. In der Literatur sind mehrere Kriterien beschrieben, welche die Beurteilung der Stabilität einer Plaque erlauben. (Rosenfeld et al., 2000; von der Thüsen et al., 2001; Williams et al., 2002; Johnson et al., 2005); diese betreffen den Kollagengehalt, den Zellgehalt und den Gehalt an glatten Muskelzellen sowie Fibrin der arteriosklerotischen Läsionen. Der Gehalt an Zellen innerhalb der einzelnen Läsionen wurde manuell beurteilt, indem auf Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten die Zahl der Zellkerne pro Quadratmikrometer neointimaler Fläche bestimmt wurde.

Für die **Hämatoxylin-Eosinfärbung** wurden die Gewebeschnitte entparaffinisiert und rehydratisiert, dann erfolgte die blaue Kernfärbung für 3 Minuten in Häma-

toxylinlösung. Die Differenzierung erfolgte unter fließendem Leitungswasser, dann die Färbung der interstitiellen Fasern sowie der Zellmembranen mit 1 %-iger Eosinlösung für 5 Minuten. Nach Spülen unter fließendem Wasser wurden die Gewebeschnitte mittels einer ansteigenden Alkoholreihe dehydratisiert.

Interstitielles Kollagen der Typen I und III wurde durch Anwendung der **Picrosiriusrotfärbung** gefolgt von Polarisationsmikroskopie dargestellt (Aikawa et al., 1998). Für die Picrosiriusrotfärbung wurden die Paraffinschnitte entparaffinisiert und rehydratisiert; anschließend in Picrosiriusrotlösung (0,1 g Siriusrot in 100 ml 1,2 %-iger wässriger Pikrinsäurelösung, Sigma Aldrich) gefärbt, dann durch kurzes Eintauchen in 100 %-igem Ethylalkohol sowie Xylol dehydriert. Unter dem Polarisationsmikroskop stellen sich dann Kollagen I und III grün-silbrig dar.

Zur Bestimmung von intraläsionalen Hämorrhagien und Erythrozyten wurde die **Masson's Trichromfärbung** verwendet. Hierbei werden die Zellkerne schwarz, Muskelfasern, Zytoplasma und Keratin rot und Kollagen blau angefärbt. Erythrozyten stellen sich ebenfalls rot dar. Nach Deparaffinisierung und Hydratisierung wurden die Gewebeschnitte mit Bouin's Fixative Solution (Pikrinsäure 75 ml, 37-40 %-iges Formaldehyd 25 ml, Eisessig 5 ml) über Nacht inkubiert. Nach Waschen unter fließendem Leitungswasser und destilliertem Wasser erfolgte zunächst die Färbung in Weigert's Iron Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich) für 10 Minuten, anschließend in Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Lösung (90 ml 1 %-iges Biebrich Scarlet, 10 ml 1 %-ige saure Fuchsinlösung, 1 ml Eisessig) für 15 Minuten. Zur Differenzierung wurde anschließend Phosphormolybdän-Phosphorwolframsäure-Lösung (5,0 g Phosphomolybdänsäure, 5,0 g Phosphorwolframsäure, 200 ml destilliertes Wasser) verwendet. Anschließend erfolgte die Färbung des Kollagen durch Anilin-Blau-Lösung (2,5 g Anilin Blau, 2,0 ml Eisessig, 100 ml destilliertes Wasser) für 10 Minuten. Zur Differenzierung wurde 1 %-iges Essigwasser für 5 Minuten angewandt. Anschließend erfolgte die Dehydratisierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

Die Gefäßläsionen wurden auf das Vorliegen einer Plaqueruptur, definiert als Unterbrechung der fibrösen Kappen mit dem Eindringen von Blutbestandteilen in die Läsion, untersucht (Williams et al., 2004). Die Anwesenheit von intraläsionalen Hämorrhagien oder Erythrozyten wurde mit Hilfe von Masson-Trichromgefärbten Gewebsektionen bestimmt.

2.5 Immunhistochemische Analyse der Plaquezusammensetzung und der Plaquevulnerabilität

Die Anwesenheit von glatten Muskelzellen wurde durch eine **immunhistochemische Färbung für α -Aktin** auf in Paraffin eingeebneten Arterienquerschnitten nachgewiesen.

Nach Entparaffinisierung und Hydratisierung der Gewebeschnitte wurde zunächst für 6 min bei 800 W in Citrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen α -Aktin spezifischen Antikörper (peroxidase markiert; Dako, Hamburg, Deutschland; Mischungsverhältnis 1:2), gefolgt von einer Inkubation mit Aminoethylcarbazolreagenz (AEC-Kit, Zymed, Berlin, Deutschland). Nach Waschen in PBS-Puffer erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne für 10 Sekunden in Gill's Hämatoxylin-Lösung, schließlich Entfernen der überschüssigen Farbreste unter Leitungswasser.

Fibrinogen und Fibrin wurden mittels einer spezifischen **immunhistochemischen Färbung für Fibrinogen und Fibrin** auf in Paraffin eingebetteten Arterienquerschnitten nachgewiesen.

Nach Entparaffinisierung und Hydratisierung wurden die Gewebeschnitte zunächst mit Zitrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0) für 6 Minuten bei 800 W inkubiert. Nach Abkühlen der Schnitte erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit 10 %-igem Ziegennormalserum (*normal goat serum*; NGS), schließlich die Inkubation mit dem Fibrin/Fibrinogen-spezifisch bindenden polyklonalen Kaninchenantikörper (Dako, Hamburg, Mischungsverhältnis 1:200). Nach Waschen in

phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS, pH 7,4) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (goat-anti-rabbit IgG, Dako, Hamburg, Mischungsverhältnis 1:100), dann erneutes Waschen in PBS. Die spezifische Anfärbung des gebundenen 2. Antikörpers erfolgte mittels der VectaStain ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und des AEC-Kits (Zymed Laboratories, San Francisco, USA). Schließlich wurde Gill's Hämatoxylin als Gegenfarbstoff eingesetzt. (vgl. Schäfer et al., 2002).

Die α -Aktin immunpositive Fläche, die Fibrin/Fibrinogen-immunpositive Fläche sowie die Kappe-Neointima-Ratio wurden im Verhältnis zur Gesamtfläche der Neointima mit Hilfe einer computerisierten Bildanalyse (ImagePro Plus) bestimmt (Pynn et al., 2004). Außerdem wurden die Anzahl der Gefäßrupturen der Lamina elastica sowie die Anzahl der fibrösen Kappen, definiert als elastinreiche Schichten innerhalb der Gefäßplaque, für jeden Schnitt bestimmt.

2.6 Laborchemische Untersuchungen

Die Bestimmung von Triglyzerid- und Cholesterinspiegel erfolgte nach Blutentnahme aus dem linken Ventrikel. Dann erfolgte die sofortige Verdünnung des Blutes mit einem Antikoagulant (3,8 %-iges Natriumzitrat im Verhältnis 1:9); im Anschluss erfolgte die Plasmaseparierung durch Zentrifugation mit 3.000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten. Schließlich wurde die Konzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterin mittels Spektrophotometrie ermittelt unter Einsatz spezifischer enzymatischer Assays (Thermo Electron Corporation, Dreieich, Germany).

2.7 Statistische Auswertungen

Alle kontinuierlichen Variablen wurden in der vorliegenden Arbeit als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben.

Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mit Hilfe des unverpaarten t-Test nach Student (GraphPad PRISM Version 4.01, GraphPad Software, Incorporation) analysiert.

Korrelationen zwischen zwei Variablen wurden mit Hilfe des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r berechnet (GraphPad PRISM Version 4.01, GraphPad Software, Incorporation)

Bezüglich des Vergleiches von nominalskalierten Parametern wurde der Fishers Exact Test angewendet (GraphPad PRISM Version 4.01, GraphPad Software, Incorporation).

Das statistische Signifikanzniveau wird in der gesamten Arbeit mit $p < 0,05$ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung der experimentell erzeugten Gefäßläsionen

3.1.1. Einfluss des Fehlens von uPA auf Körpergewicht und Blutfettwerte

Für die Erzeugung experimenteller Gefäßläsionen mit dem Eisenchloridmodell wurden weibliche und männliche Mäuse im Alter von 14 bis 18 Wochen verwendet. Es wurden insgesamt 4 verschiedene Versuchsgruppen gebildet: Apolipoprotein E-Knockoutmäuse (apoE^{-/-} x uPA^{+/+}; apoE-KO), sowie Apolipoprotein E x Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Doppelknockoutmäuse (apoE^{-/-} x uPA^{-/-}; DKO), welche zuvor für 6 bis 8 Wochen jeweils entweder mit normalem Nagetierfutter oder mit Futter mit hohem Fettanteil (*high fat diet*; HFD) gefüttert worden waren.

Um zunächst zu untersuchen, ob sich das Fehlen von Urokinase-Plasminogen-Aktivator *per se* auf das Gewicht oder die Blutfettwerte der Apolipoprotein-Knockout Mäuse auswirkt, wurden Gewicht, Serum-Cholesterin und –

Triglyzeridspiegel bei 12 Wochen alten Mäusen, also zum Zeitpunkt der Gewe-beentnahme nach Induktion der Neointimabildung, erhoben. Die Ergebnisse der Analysen sind in **Tabelle 1** dargestellt:

	apoE-KO (n=14)	apoE-KO + HFD (n=11)	DKO (n=14)	DKO+ HFD (n=13)
Körpergewicht (g)	23 ± 0,9	24 ± 1,6	25 ± 0,6	28 ± 2,8
Plasma- Gesamtcholesterin (mg/dl)	163 ± 8	480 ± 24 p<0,0001 vs apoE-KO	190 ± 10	408 ± 71 P<0,001 vs. DKO
Plasmatriglyzeride (mg/dl)	111 ± 3	158 ± 8 p<0,005 vs. apoE-KO	118 ± 2	136 ± 8 p<0,05 vs. DKO

Tabelle 1: Körpergewicht und Blutfettwerte zum Zeitpunkt der Gewe-beentnahme

Es ergeben sich signifikante Unterschiede in Bezug auf das Plasmagesamtcholesterin zwischen Mäusen mit normaler und fettreicher Nahrung.

n = Anzahl der untersuchten Tiere

Hierbei zeigte sich, dass durch HFD die Gesamtcholesterinwerte sowie die Triglyzeridwerte im Plasma sowohl bei apoE-KO als auch bei DKO-Mäusen gleichermaßen signifikant erhöht wurden, während das Körpergewicht bei allen Versuchstiergruppen ähnlich war. Das Fehlen von uPA führte weder unter Standardfutter noch unter fettreicher Nahrung nicht zu einer Veränderung der für die Pathogenese der Arteriosklerose relevanten Blutfettwerte.

3.1.2 Einfluss des Fehlens von uPA auf die akute thrombotische Reaktion nach Gefäßwandverletzung

Um die Auswirkungen des Fehlens von uPA auf den Ablauf einer arteriellen Thrombose zu untersuchen, wurde die Zeit von Beginn der Applikation des Eisenchlorides bis zum vollständigen thrombotischen Verschluss der Arteria carotis bestimmt. Mittels einer Flowsonde wurde kontinuierlich der Blutfluß in der Arteria carotis bestimmt. Bei Abfall des Blutflusses unter 0,2 Milliliter pro Minute wurde der Zeitpunkt als Zeitpunkt des thrombotischen Verschlusses notiert. Kam es nicht zu einem vollständigen Sistieren des Blutflusses, wurde der Zeitpunkt mit 25 Minuten notiert.

Abbildung 4 veranschaulicht die Zeit bis zum erstmaligen kompletten thrombotischen Gefäßverschluss in den einzelnen Versuchsgruppen.

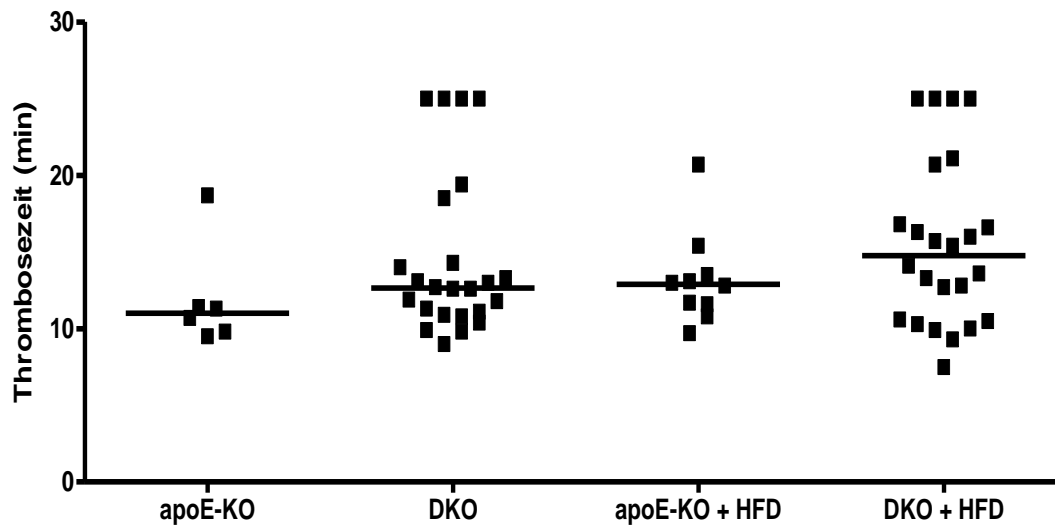


Abbildung 4: Zusammenfassende Darstellung der einzelnen und medianen Zeiten bis zum thrombotischen Gefäßverschluss. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Thrombosezeiten aller Gruppen. Dargestellt sind Einzelwerte und der Median pro Gruppe.

Bezüglich des Thrombosezeitpunktes zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den vier Versuchsgruppen.

Als Marker für die Effektivität der endogenen Fibrinolyseaktivität wurde nach einem Beobachtungszeitraum von 25 Minuten nach Induktion der Thrombose bestimmt, bei wie vielen Mäusen das Gefäß noch verschlossen (definiert als Blutfluss unter 0,2 ml/min) bzw. wieder eröffnet war (definiert als Blutfluss über 0,2 ml/min). Es zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt 35 % der Arterien bei apoE-KO-Mäusen (8 von 23) und 33 % bei DKO-Mäuse (9 von 28) rekanalisiert hatten. In den Fettfuttergruppen ergaben sich für beide Genotypen nominell niedrigere Werte: 0 % (0 von 10) der apoE-KO + HFD-Mäuse und 19 % (5 von 24) der Doppelknockout + HFD-Mäuse waren nach 25 Minuten rekanalisiert, wie in **Abbildung 5** graphisch illustriert.

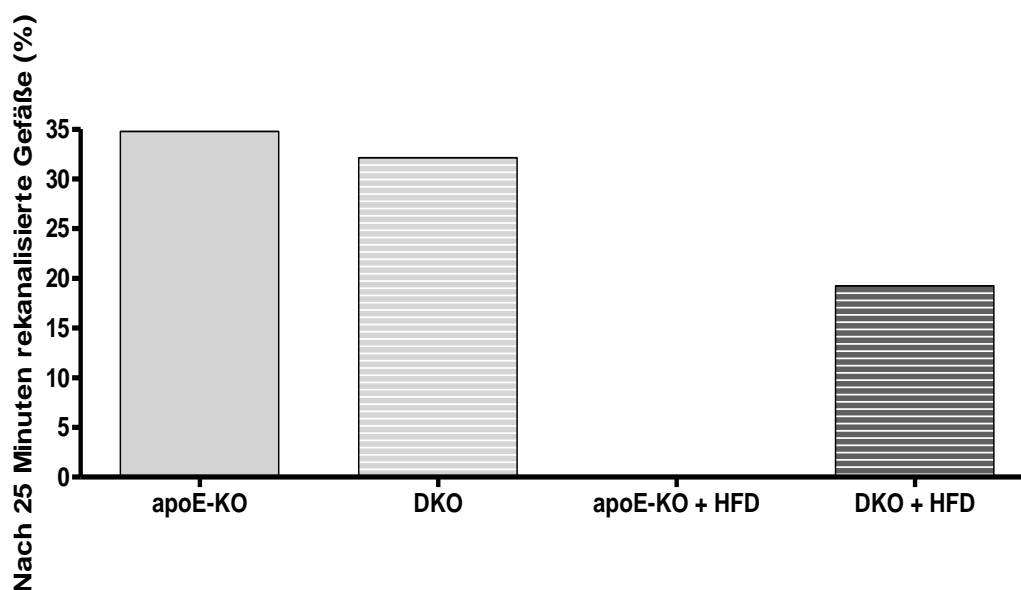


Abbildung 5: Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils der nach 25 Minuten rekanalisierten Gefäße

Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Rekanalisierungsrate zeigten sich für keine der dargestellten Gruppen.

3.1.3 Einfluss des Fehlens von uPA auf die chronische Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung

Drei Wochen nach der Gefäßverletzung wurde erneut der Blutfluß in der Arteria carotis und so die Rekanalisierungsrate bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in **Abbildung 6** dargestellt.

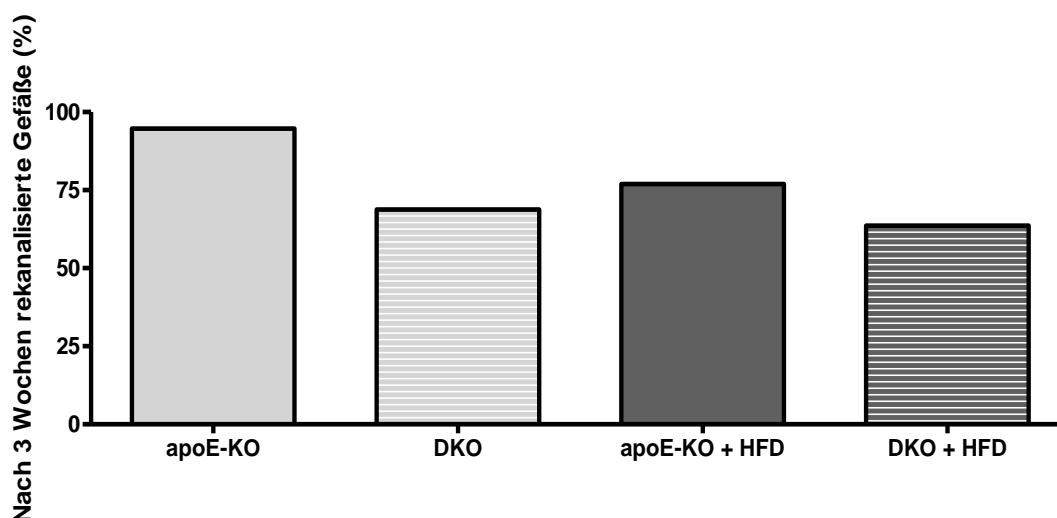


Abbildung 6: Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils der nach 3 Wochen rekanalisierten Gefäße

Es zeigten sich zu diesem Zeitpunkt in allen Gruppen weniger Gefäße vollständig verschlossen als 25 Minuten nach der Gefäßverletzung. In allen Versuchsgruppen waren mehr als 60 % der Arterien wiedereröffnet.

ApoE-KO-Mäuse wiesen dabei mit einer Rekanalisierungsrate von 95 % (18 von 19) den höchsten Wert auf und unterscheiden sich damit von den weiteren Gruppen. Bei den DKO lag die Rekanalisierungsrate mit 69 % (11 von 16) in einem tendenziell niedrigeren Bereich, ebenso wie die Rekanalisierungsraten der DKO + HFD-Mäuse von 64 % (14 von 22) und der apoE-KO + HFD-Gruppe mit 77 % (10 von 13). Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen keinen der Versuchsgruppen.

Drei Wochen nach Induktion der Gefäßverletzung wurde das Gefäßgewebe entnommen und die Neointimabildung an histologischen Gewebequerschnitten nach Färbung mit **Verhoeff's Elastikafärbung** quantifiziert.

Abbildung 7 zeigt eine repräsentative Darstellung der Neointima einer apoE-KO (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) nach 3 Wochen.

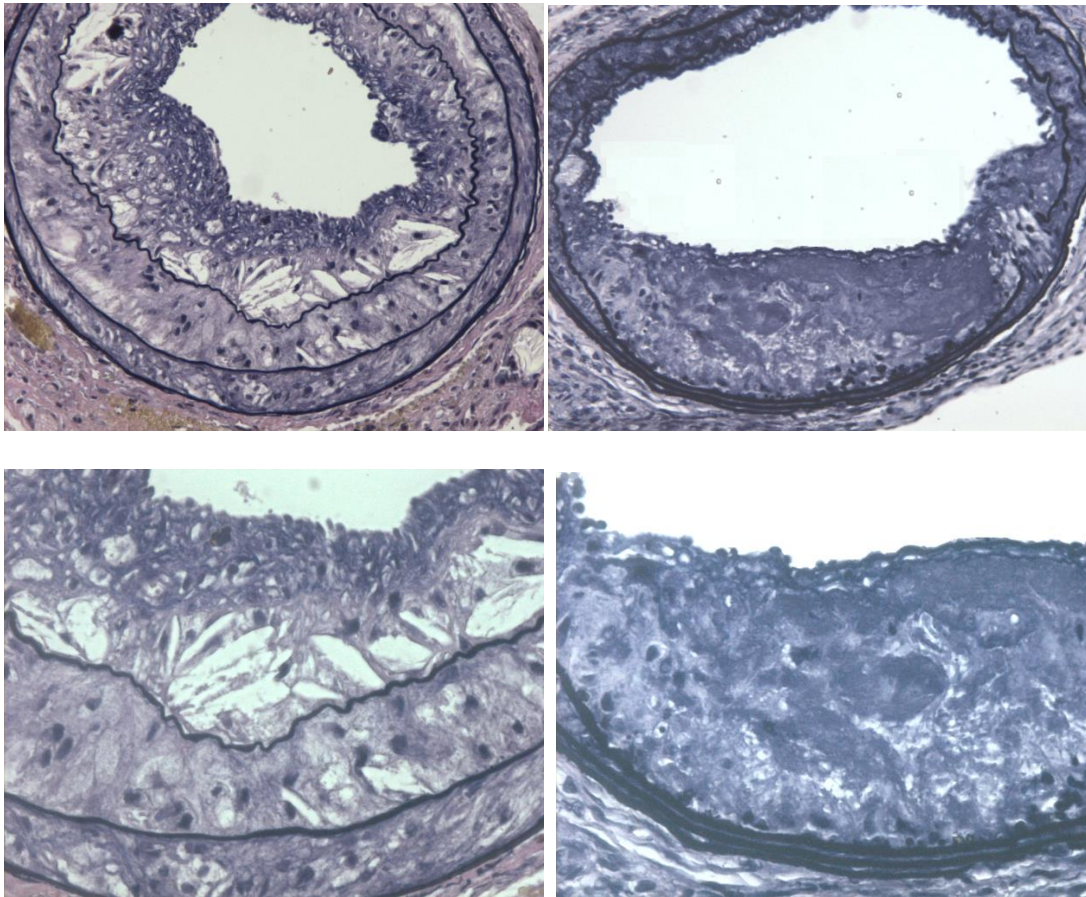


Abbildung 7: Repräsentative Abbildung einer Neointima 3 Wochen nach Gefäßverletzung im apoE-KO- bzw. DKO-Mausmodell.

Repräsentative Schnitte durch die Neointima einer apoE-KO-Maus (links) sowie der DKO-Maus (rechts. in 200facher Vergrößerung (oben) bzw. in 400facher Vergrößerung (unten)

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Neointimafläche sind in **Abbildung 8** dargestellt.

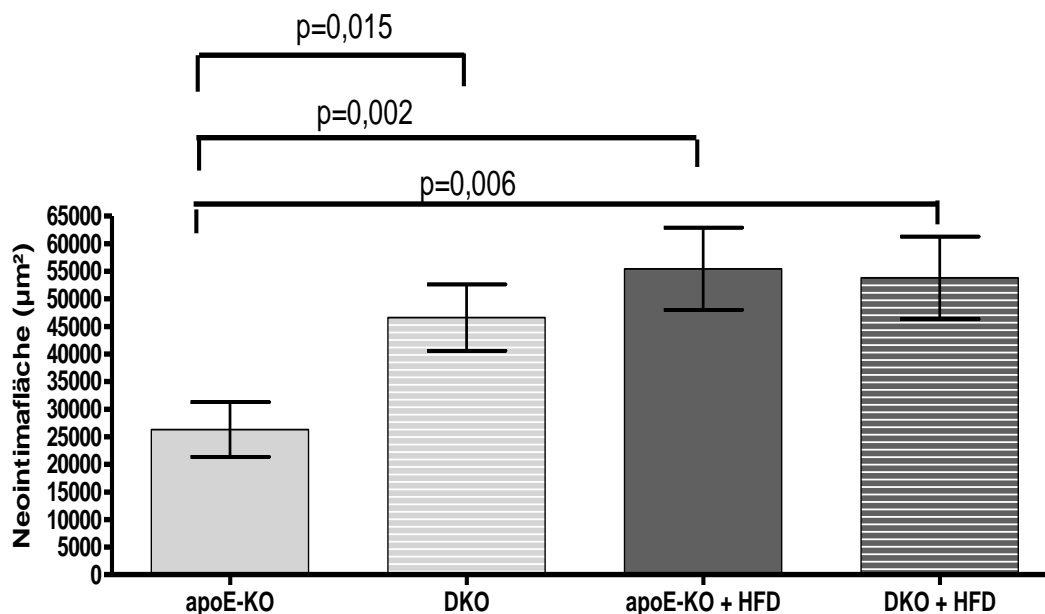


Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung der Neointimaflächen 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler pro Versuchsgruppe 3 Wochen nach Induktion der Gefäßwandverletzung. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angegeben.

Zu diesem Zeitpunkt wiesen sämtliche Versuchsgruppen ein deutliches neointimales Wachstum auf. Die Neointima der apoE-KO Mäuse (durchschnittlich $26.321 \pm 4.956 \mu\text{m}^2$) war dabei signifikant kleiner als die Neointima der DKO-Mäuse (durchschnittlich $46.610 \mu\text{m}^2$; $p=0,015$) und der DKO + HFD Gruppe (durchschnittlich $53.820 \mu\text{m}^2$; $p = 0,006$). Ebenso resultierte bei den apoE-KO-Mäusen die Gabe von Fettfutter in einer signifikant größeren Neointima in der apoE-KO + HFD Gruppe (durchschnittlich 55.450 ; $p = 0,002$). Die Unterschiede der Neointimagröße zwischen den DKO, den DKO + HFD sowie die apoE-KO + HFD waren nicht signifikant.

Aus dem Anteil der Neointimafläche an der Gesamtfläche innerhalb der *Lamina elastica interna* ergibt sich die prozentuale Lumenstenose, welche in **Abbildung 9** veranschaulicht wird:

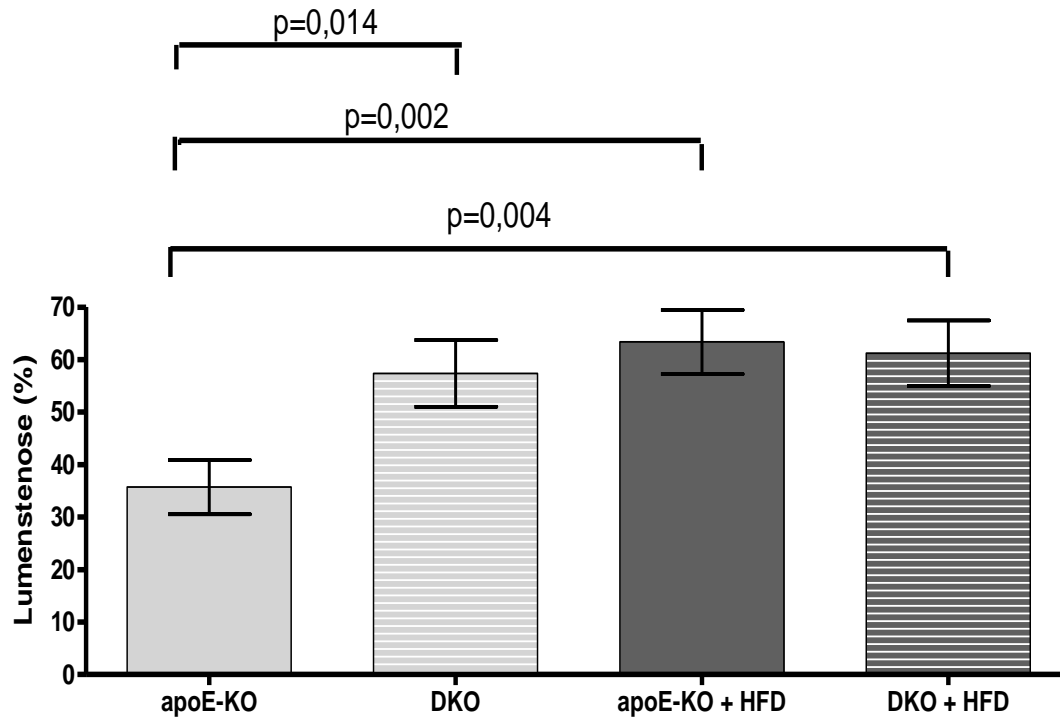


Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung der prozentualen Lumenstenose 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler pro Versuchsgruppe 3 Wochen nach Induktion der Gefäßwandverletzung. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angegeben.

Es ergibt sich eine signifikant höhere Stenosierung des Gefäßlumens für DKO - Mäuse (durchschnittlich 57,4 %) gegenüber den apoE-KO-Mäusen (durchschnittlich 35,7 %; $p = 0,014$) sowie von DKO + HFD Mäusen (durchschnittlich 61,2 %) gegenüber den apoE-KO-Mäusen ($p = 0,004$). Auch die apoE-KO + HFD - Gruppe zeigte eine signifikant stärkere Stenosierung des Lumens (durchschnittlich 63,4 %) im Vergleich mit der apoE-KO-Gruppe ($p = 0,002$). Zwischen den

drei Gruppen DKO, DKO + HFD und apoE-KO + HFD ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Veränderungen der Media waren nach Induktion der Thrombosen schon mikroskopisch auffällig, weshalb im Folgenden die Fläche der Media (vgl. **Abbildung 10**) sowie der Intima-Media-Quotient (vgl. **Abbildung 11**) für die einzelnen Genotypen bestimmt wurden.

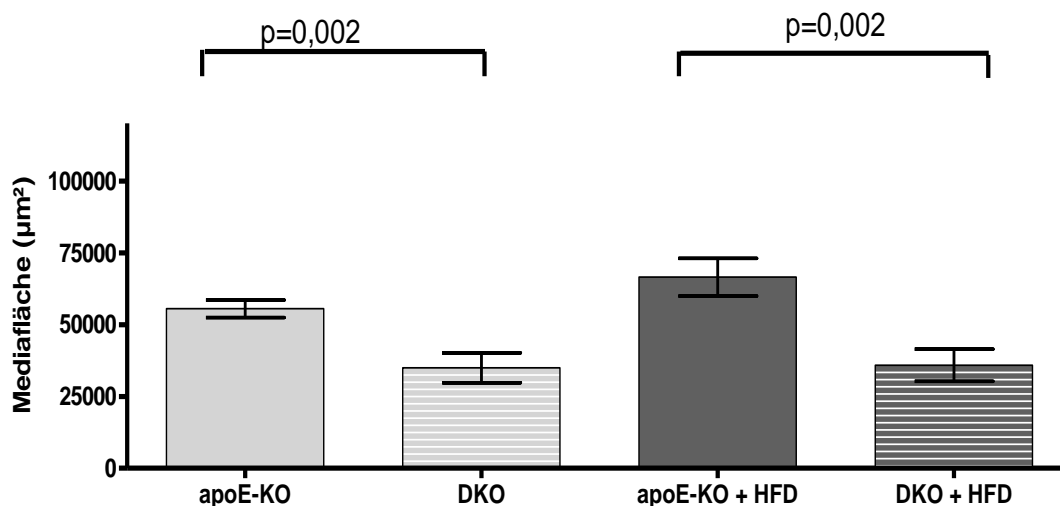


Abbildung 10: Zusammenfassende Darstellung der Mediafläche 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler pro Versuchsgruppe 3 Wochen nach Induktion der Gefäßwandverletzung. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angegeben.

Die Größe der Media ist sowohl bei den DKO- Mäusen gegenüber den apoE-KO Mäusen signifikant reduziert. Dies gilt sowohl für die Gruppe mit Standardfutter (Mediafläche der DKO-Mäuse $34.960 \pm 5.196 \mu\text{m}^2$ vs. apoE-KO-Mäuse $55.520 \pm 3.068 \mu\text{m}^2$; $p = 0,002$), als auch für die Gruppe mit fettreichem Futter (Mediafläche der DKO + HFD-Mäuse $30.690 \pm 5.586 \mu\text{m}^2$ vs. apoE-KO + HFD-Mäuse $66.530 \pm 6.549 \mu\text{m}^2$, $p = 0,002$).

Innerhalb eines Genotyps finden sich keine von der Futterart abhängigen signifikanten Unterschiede bezüglich der Mediafläche.

In einem nächsten Schritt folgte die Bestimmung des Quotienten aus der Neointimafläche und der Mediafläche, des Intima-Media-Quotienten. Dieser ist in **Abbildung 11** dargestellt:

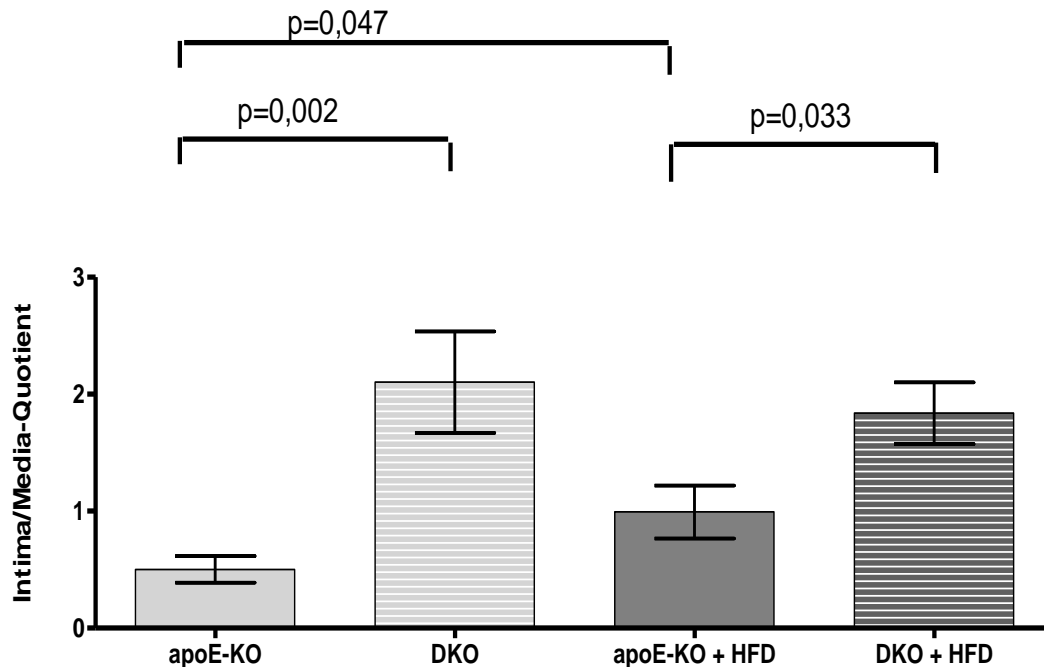


Abbildung 11: Zusammenfassende Darstellung des Intima-Media-Quotienten 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler pro Versuchsgruppe 3 Wochen nach Induktion der Gefäßwandverletzung. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angegeben.

Die ermittelten Intima-Media-Quotienten sind für die DKO-Mäuse gegenüber den apoE-KO-Mäusen signifikant erhöht (durchschnittlich $2,10 \pm 0,43$ vs. $0,50 \pm 0,11$, $p = 0,002$). Die gilt entsprechend auch für die Versuchsgruppen mit fettreichem Futter ($1,84 \pm 0,26$ vs. $0,99 \pm 0,23$; $p = 0,033$). Ein weiterer signifikanter Unterschied ergibt sich zwischen den apoE-KO-Mäusen mit Standardfutter und den

apoE-KO + HFD-Mäusen ($p = 0,047$). Bei den den DKO ergibt sich keine Abhängigkeit des Intima-Media-Quotienten vom Futter.

Aneurysmabildung ist eine häufige Komplikation der Arteriosklerose und des vaskulären Remodellings. Deshalb wurde der Gesamtdurchmesser der Carotisarterien ebenfalls erfasst (vgl. **Abbildung 12**).

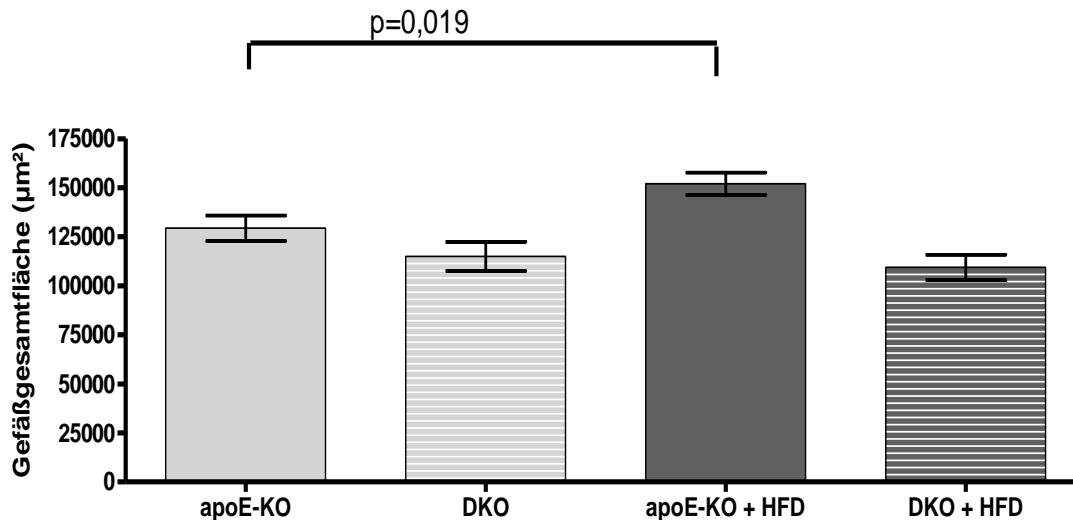


Abbildung 12: Zusammenfassende Darstellung der Gefäßgesamtflächen 3 Wochen nach Verletzung

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler pro Versuchsgruppe 3 Wochen nach Induktion der Gefäßwandverletzung. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angegeben.

Die Gefäßgesamtflächen der apoE-KO-Mäuse ($129.400 \pm 6.495 \mu\text{m}^2$) und der DKO-Mäuse ($144.900 \pm 7.448 \mu\text{m}^2$) unterscheiden sich nicht signifikant. Auch bei zusätzlicher Gabe von Fettfutter ergeben sich keine Unterschiede zwischen apoE-KO + HFD und DKO + HFD ($152.100 \pm 5696 \mu\text{m}^2$ vs. $109.400 \pm 6443 \mu\text{m}^2$)

Die Mäuse der apoE-KO + HFD-Gruppe weisen eine signifikant größere Gefäßgesamtfläche auf als die Mäuse der apoE-KO-Gruppe ($p = 0,019$). Zwischen der

DKO-Gruppe und der DKO + HFD-Gruppe ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Im Weiteren wurde die qualitative Zusammensetzung der Plaques näher untersucht. Der Gehalt an SMCs wurde mittels einer immunhistochemischen Färbung für α -Aktin untersucht. Hier zeigte sich, daß Läsionen der apoE-KO-Mäuse vergleichsweise viele α -Aktin-positive glatte Muskelzellen – besonders in den Kappen – enthielten, während die Läsionen der Doppelknockoutmäuse vergleichsweise arm an α -Aktin-positiven glatten Muskelzellen und die Kappen entsprechend deutlich schmaler waren.

Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives Beispiel der immunhistochemischen α -Aktin-Färbung.

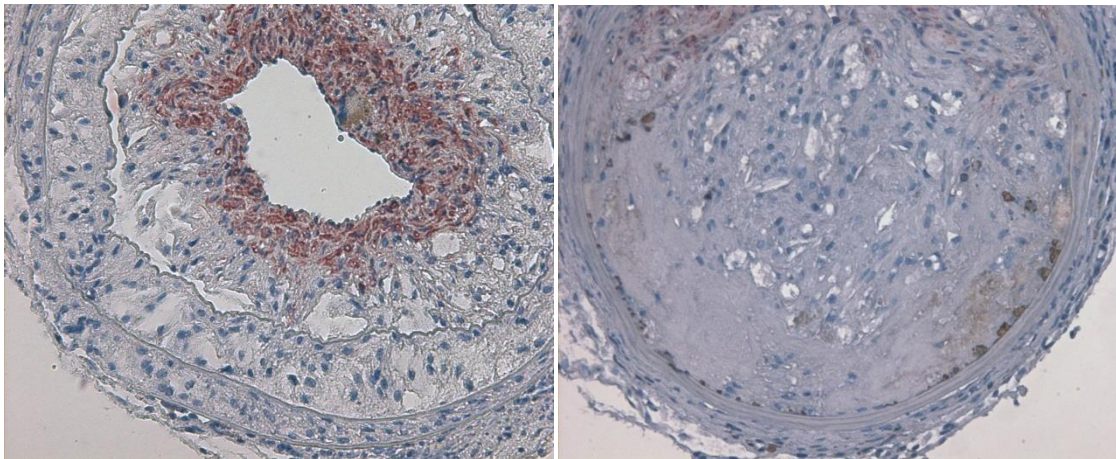


Abbildung 13: Repräsentative Abbildungen nach immunhistochemischer Anfärbung von α -Aktin innerhalb der Neointima.

Lichtmikroskopische Darstellung der Neointima einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in der α -Aktin-Färbung (rot) in 200facher Vergrößerung

Bei der Quantifizierung der α -Aktin-positiven Flächen wurde diese auf die Fläche der Neointima bezogen und als Anteil an der Neointimafläche angegeben (vgl.

Abbildung 14):

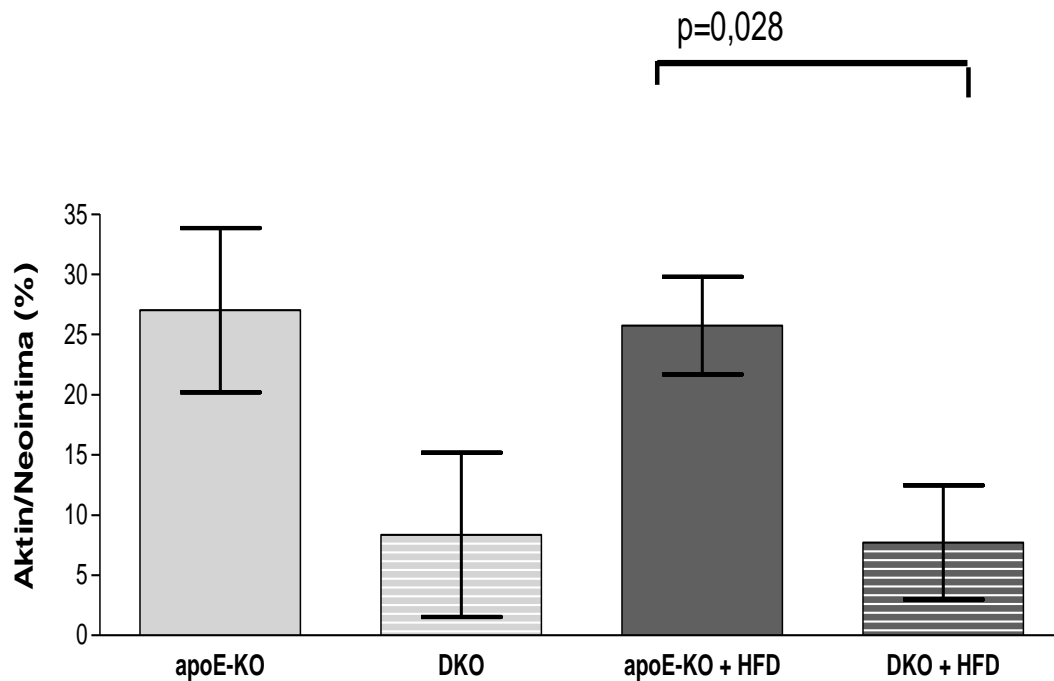


Abbildung 14: Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils der α -Aktin-positiven Flächen 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung.

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler pro Versuchsgruppe 3 Wochen nach Induktion der Gefäßwandverletzung. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angegeben.

Zwischen den apoE-KO-Mäusen ($27,02 \pm 6,8$ %) und den DKO-Mäusen ($8,36 \pm 6,83$ %) ergab sich kein signifikanter Unterschied in der statistischen Analyse. Die apoE-KO + HFD ($25,75 \pm 4,06$ %) wiesen aber, verglichen mit der DKO + HFD-Gruppe ($7,72 \pm 4,73$ %), eine signifikant höhere α -Aktin-positive Fläche auf ($p = 0,028$). Durch die Gabe von fettreichem Futter wurde weder im apoE-KO-Genotyp, noch im DKO-Genotyp der Anteil an α -Aktin an der Neointima verändert.

Im Rahmen der experimentell induzierten Gefäßwandverletzung wird Fibrin als integraler Bestandteil der Thrombusbildung erzeugt. Die Persistenz von Fibrin innerhalb der Neointima wurde mithilfe einer immunhistochemischen Färbung für

Fibrin und Fibrinogen quantifiziert. Während in den Läsionen der apoE-KO-Mäuse nur wenig Fibrin in der Neointima nachzuweisen war, zeigten sich bei den DKO-Mäusen ausgedehnte fibrinreiche Areale in der Neointima.

Abbildung 15 zeigt ein repräsentatives Beispiel der immunhistochemischen Fibrinfärbung:

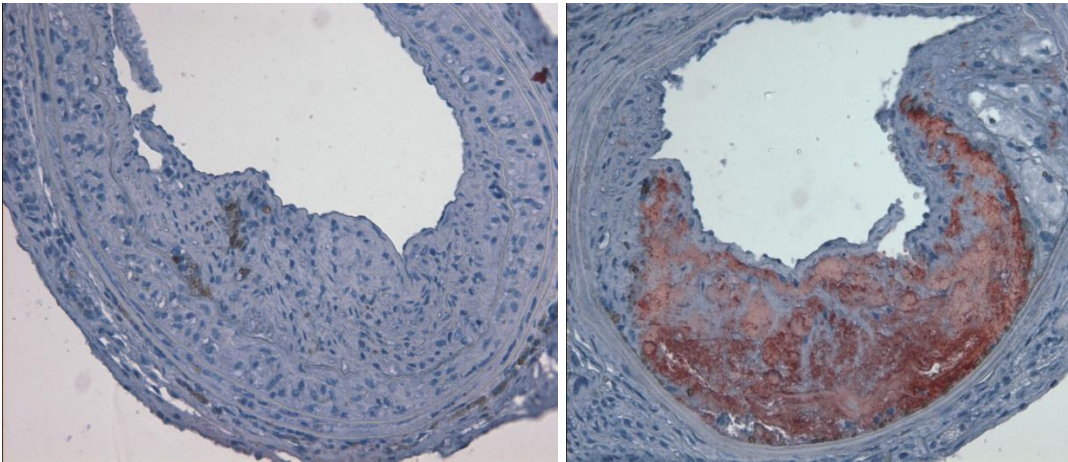


Abbildung 15: Repräsentative Abbildungen nach immunhistochemischer Anfärbung von Fibrinogen und Fibrin.

Neointima einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in der Immunhistochemischen Färbung für Fibrinogen und Fibrin (rot). Vergrößerung: 200fach

In der quantitativen Analyse wurde in **Abbildung 16** die Fibrin- und Fibrinogen-positive Fläche anteilig an der Gesamtfläche der Neointima angegeben.

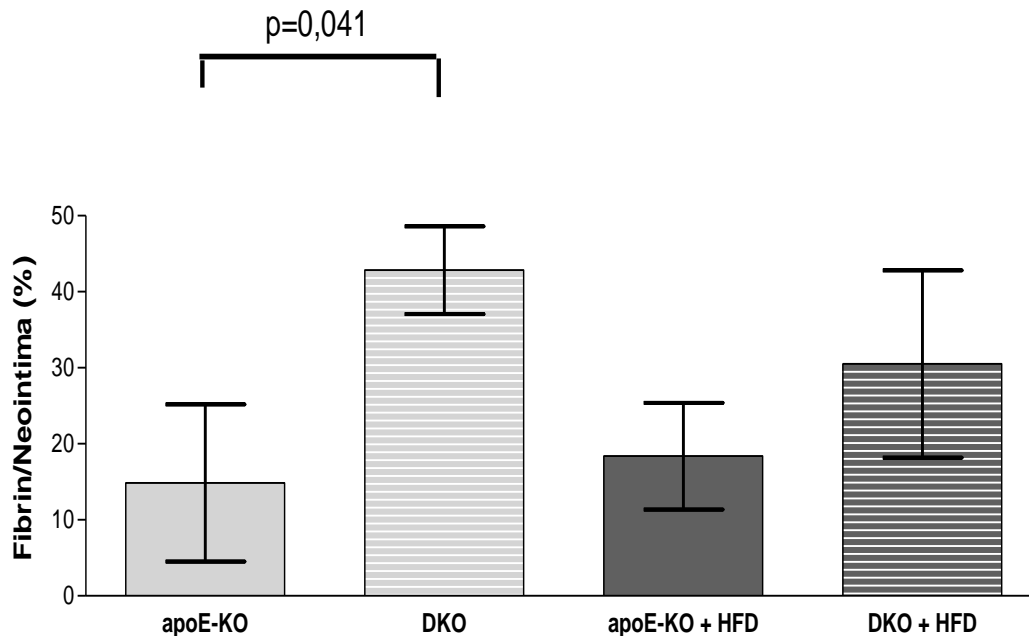


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils Fibrinogen und Fibrin-positiver Fläche 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung.

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler pro Versuchsgruppe 3 Wochen nach Induktion der Gefäßwandverletzung. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind ebenfalls angegeben.

Die quantitative Analyse zeigt eine signifikante Erhöhung der Fibrin-positiven Fläche der DKO-Mäuse ($42,84 \pm 5,78$ %) gegenüber den apoE-KO-Mäusen ($14,86 \pm 10,33$ %) bei Gabe von normalem Futter ($p = 0,041$). Für die apoE-KO + HFD ($18,38 \pm 7,03$) und die DKO + HFD ($30,50 \pm 12,29$ %) ergab sich kein signifikanter Unterschied. Auch die Gabe von fettreichem Futter statt Standardfutter führte zu keiner signifikanten Veränderung der Fibrin-positiven Fläche; dies gilt für beide Genotypen.

Zusätzlich wurden die Neointima von apoE-KO und DKO-Mäusen mit normalem Futter sowie HFD auf das Vorhandensein von **Stabilitätskriterien** untersucht:

1. Das Verhältnis der Fläche der Neointimakappe zur Gesamtfläche der Neointima.
2. Die Zahl der Rupturen der elastischen Laminae der Gefäßmedia; Hierbei wurde die durchschnittliche Anzahl der Rupturen pro Maus über insgesamt 5 repräsentative Schnitte bestimmt. Angegeben wurde der Anteil der Mäuse mit durchschnittlich > 1 Ruptur der elastischen Laminae pro Schnitt an der untersuchten Gesamtanzahl der Mäuse.
3. Die Größe der Fläche der Einblutungen in die Neointima wird als Anteil der Gesamtfläche der Neointima angegeben.
4. Die Zahl der Zellkerne bezogen auf die Neointimafläche als Maß der Zellularität.

Die Ergebnisse dieser Auswertung werden in **Tabelle 2** veranschaulicht:

	apoE-KO	DKO	apoE-KO + HFD	DKO + HFD
Kappen-Neointima-Verhältnis	1,0 ± 0,07	0,4 ± 0,02 <i>*p=0,016 vs. apoE-KO</i>	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,2 <i>*p=0,02 vs. apoE-KO + HFD</i>
Rupturen der elastischen Laminae (%)	21,4 (3 von 14)	46,7 (7 von 15) <i>p=0,53 vs. apoE-KO</i>	11,1 (1 von 9)	69,2 (9 von 13) <i>p=0,18 vs. apoE-KO + HFD</i>
Einblutungen in die Neointima (%)	0,3 ± 0,3	11,9 ± 8,1 <i>*p=0,043 vs. apoE-KO</i>	2,5 ± 1,7	19,3 ± 9,6 <i>p=0,051 vs. apoE-KO + HFD</i>
Zellularität (10⁻³ /µm²)	4,7 ± 0,3	3,0 ± 0,6 <i>*p=0,021 vs. apoE-KO</i>	5,1 ± 0,5	2,8 ± 0,5 <i>*p=0,012 vs. apoE-KO + HFD</i>

Tabelle 2: Histologische Marker für Plaquestabilität/-instabilität einer Neointima 3 Wochen nach Gefäßwandverletzung

- Kappen-Neointima-Verhältnis: Fläche der Kappe/Gesamtfläche der Neointima
- Rupturen der elastischen Laminae: Anteil der Mäuse mit mehr als 1 Ruptur der elastischen Laminae pro Schnitt in %
- Einblutungen in die Neointima: Fläche der Einblutungen in % der Neointimafläche
- Zellularität der Neointima: Anzahl der kernhaltigen Zellen der Neointima, angegeben in 10^{-3} Zellen pro μm^2 Neointima]

In dieser Analyse zeigen DKO-Mäuse unabhängig vom verabreichten Futter eine signifikante Reduktion des Kappe-Neointima-Verhältnisses. Ebenso weisen die DKO-Mäuse unabhängig vom Futter mehr Rupturen der elastischen Laminae auf, ein signifikanter Unterschied ergab sich für diesen Marker allerdings nicht. Die Fläche der Einblutungen in die Neointima war bei den DKO-Mäuse signifikant größer als bei den apoE-KO-Mäusen bei normaler Diät. Desweiteren zeigt sich eine signifikante Reduktion der Zellularität der DKO-Mäuse gegenüber den apoE-KO-Mäuse in beiden Futtergruppen.

Zusammenfassend kann man demnach feststellen, dass ein Mangel an Urokinase-Plasminogen-Aktivator in apoE-KO-Mäusen die Größe und den Grad der Lumenstenose der Neointima verstärkte, während die Mediadicke sowie die Gefäßgesamtfläche reduziert waren. Darüber hinaus war auch die Plaquezusammensetzung nach der experimentellen Gefäßverletzung beim Fehlen von uPA verändert. Insbesondere war ein Mangel an Urokinase-Plasminogen-Aktivator mit einer signifikant reduzierten Zellularität und Gehalt an glatten Muskelzellen sowie einem signifikanten Anstieg des Fibrinogen- und Fibringehaltes assoziiert. Die Untersuchten Surrogatparameter für die Plaquestabilität (Zellularität, Kappen-Neointima-Verhältnis, Rupturen der elastischen Laminae und Einblutungen in die Neointima) belegen eine verminderte Plaquestabilität durch das Fehlen des uPA-Gens.

3.2. Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Gefäßläsionen

3.2.1 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Gefäßläsionen der Aortenwurzel

Um die Rolle des Urokinase-Plasminogen-Aktivators in der Pathophysiologie sich spontan entwickelnder arteriosklerotischer Plaques genauer zu charakterisieren, wurden Gefäßquerschnitte durch die proximale Aorta, die Koronararterien und die Brachiozephalarterie von 12 Monate alten apoE-KO und DKO Mäusen untersucht.

Abbildung 17 zeigt repräsentative histologische Schnitte durch die Aortenwurzel.

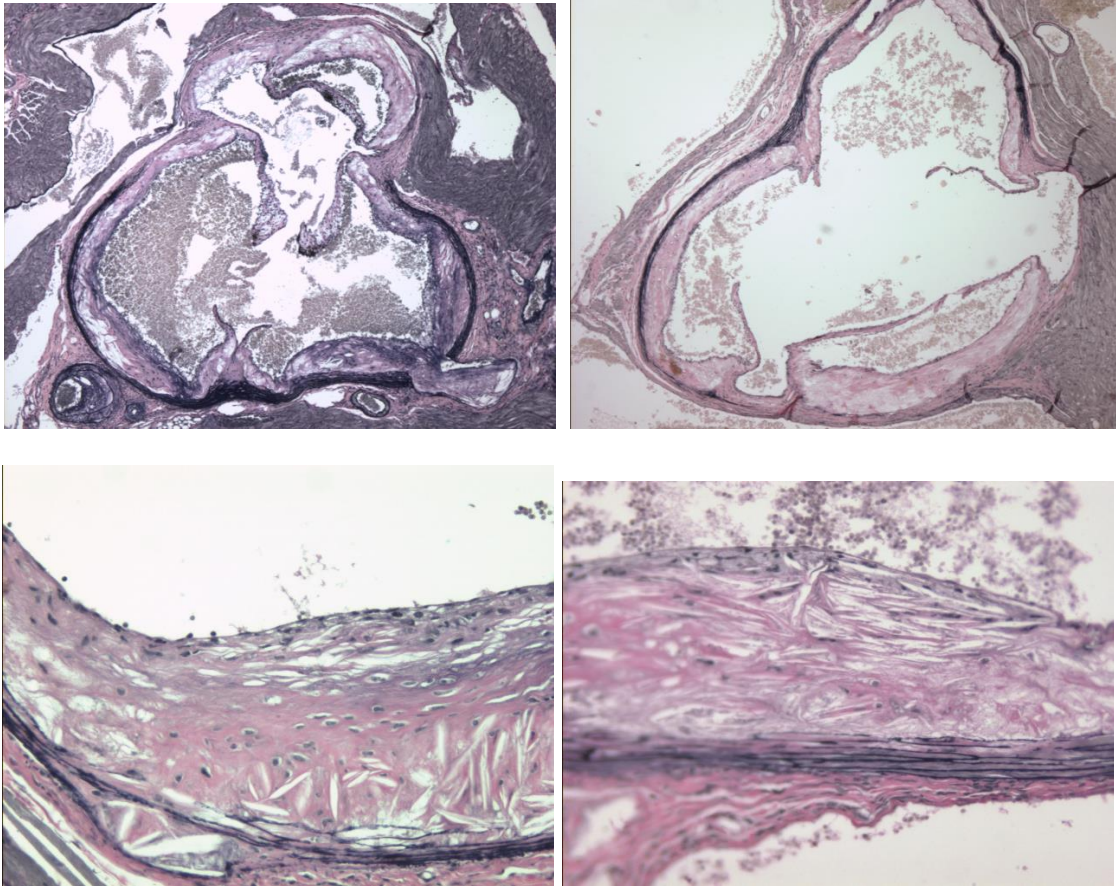


Abbildung 17: Repräsentative Abbildungen spontaner arteriosklerotischer Läsionen an der Aortenwurzel im apoE-KO- bzw. DKO-Mausmodell.

Lichtmikroskopische Darstellung in Verhoeff's Elastikafärbung. Schnitte durch die Aortenwurzel einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in 40facher Vergrößerung (oben) bzw. 200facher Vergrößerung (unten)

Die jeweilige Plaquegröße ist in **Abbildung 18** dargestellt:

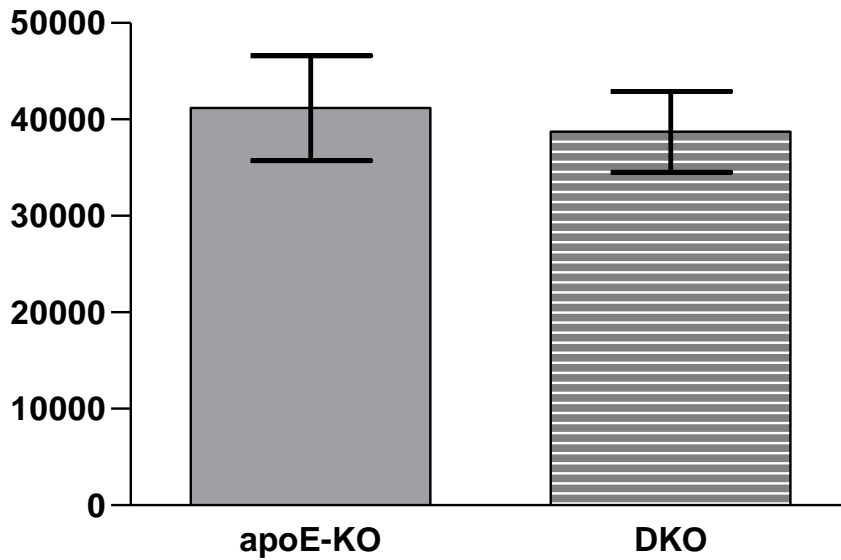


Abbildung 18: Zusammenfassende Darstellung der Fläche arteriosklerotischer Läsionen an der Aortenwurzel 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für jeden Genotyp bei 12 Monate alten Mäusen. Die Angabe der gemessenen Flächen erfolgt in μm^2 . Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die durchschnittliche Plaquerfläche betrug $41.172 \pm 5.423 \mu\text{m}^2$ für die Mäuse mit dem apoE-KO-Genotyp und $38.714 \pm 4.183 \mu\text{m}^2$ für die Mäuse mit DKO-Genotyp. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Arteriosklerotische Plaques an der Aortenwurzel wiesen zudem deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung auf. In einer immunhistochemischen Färbung wurde der Anteil an Fibrin und Fibrinogen an der Plaquerfläche bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in **Abbildung 19** dargestellt:

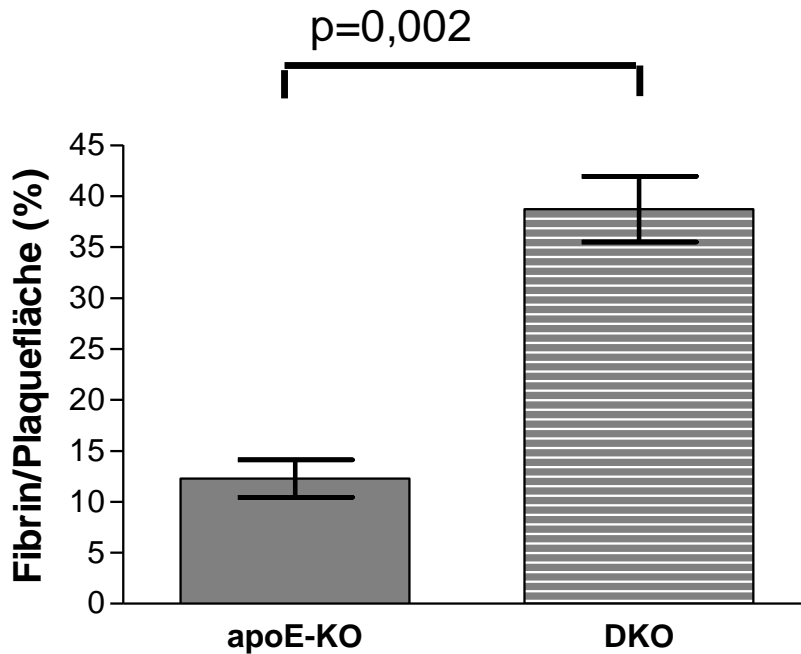


Abbildung 19: Zusammenfassende Darstellung des prozentualen Anteils Fibrin/Fibrinogen-positiver Flächen der arteriosklerotischen Plaques an der Aortenwurzel 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt ist der Fibrin- und Fibrinogenanteil an der Gesamtfläche der Plaques in Prozent nach Genotyp sowie die zugehörige statistische Analyse. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

So zeigte die spezifische Färbung für Fibrin-positive Areale kein oder wenig Fibrin in den apoE-KO-Mäusen ($12,29 \pm 1,85$ %); dagegen entwickelten die Doppelknockoutmäuse große fibrinreiche Flächen ($38,72 \pm 3,24$ %) in den Plaques der proximalen Aorta. In der quantitativen Analyse zeigten sich signifikante Unterschiede der immunhistochemisch Fibrin-positiven Flächen zwischen den Genotypen ($p = 0,002$).

Die spezifische Färbung für α -Aktin-positive glatte Muskelzellen zeigte unabhängig vom Genotyp in dieser Lokalisation nur sehr wenige α -Aktin-positive Areale in der Gefäßintima, wie in den repräsentativen Schnitten in **Abbildung 20** gezeigt:

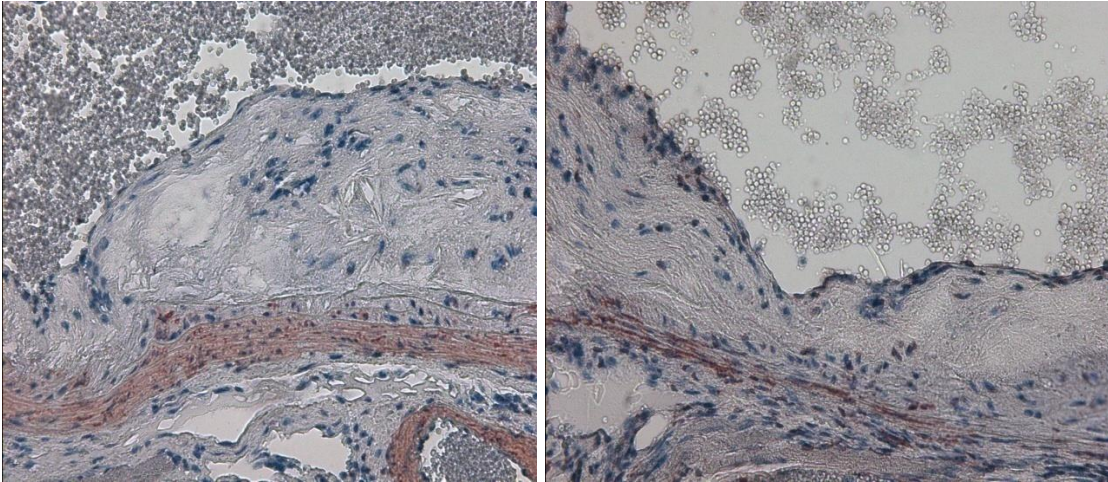


Abbildung 20: Repräsentative Bilder nach immunhistochemischer Anfärbung von α -Aktin in arteriosklerotischen Plaques an der Aortenwurzel 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt sind die Plaques einer apoE-KO-Maus (links) sowie eine DKO-Maus (rechts) in der α -Aktin-Färbung (rot) in 200facher Vergrößerung

Aufgrund des sehr geringen Anteiles wurde auf einen quantitativen Vergleich der α -Aktin-positiven Flächen verzichtet.

Für die Bestimmung der Zellularität der Plaques wurde die Zellzahl manuell bestimmt. Diesbezüglich ergaben sich eine nicht signifikante Reduktion in den DKO-Mausläsionen, wie in **Abbildung 21** gezeigt.

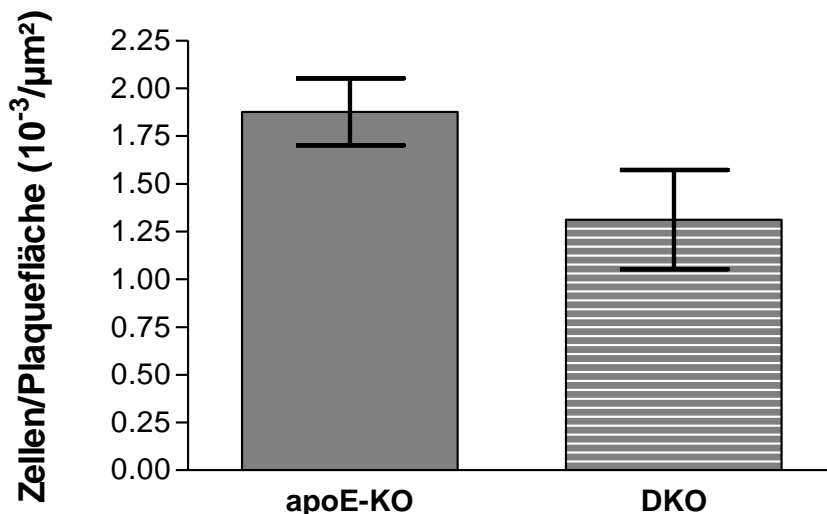


Abbildung 21: Zusammenfassende Darstellung der Zellularität arteriosklerotischer Plaques der Aortenwurzel 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp.

Für die apoE-KO-Mäuse ergab sich eine Zellzahl von durchschnittlich $1,88 \pm 0,18 \times 10^{-3}$ Zellen pro μm^2 Plauefläche, für die DKO-Mäuse von $1,31 \pm 0,26 \times 10^{-3}$ pro μm^2 Plauefläche. Bezüglich der Zellularität der Läsionen der Aortenwurzel ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Zusammenfassend zeigte sich in den arteriosklerotischen Läsionen der Aortenwurzel kein Unterschied, was die Größe und die Zellularität der Läsionen angeht. Für beide Genotypen bestand ein sehr geringer Gehalt an glatten Muskelzellen. Der Fibrinogengehalt der Läsionen der DKO-Mäuse war gegenüber den apoE-KO-Mäusen signifikant erhöht.

3.2.2 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Gefäßläsionen der Koronararterien

Im Bereich der **Koronararterien** bildeten sich bei beiden Genotypen arteriosklerotische Plaques. Repräsentative Beispiele zeigt **Abbildung 22**:

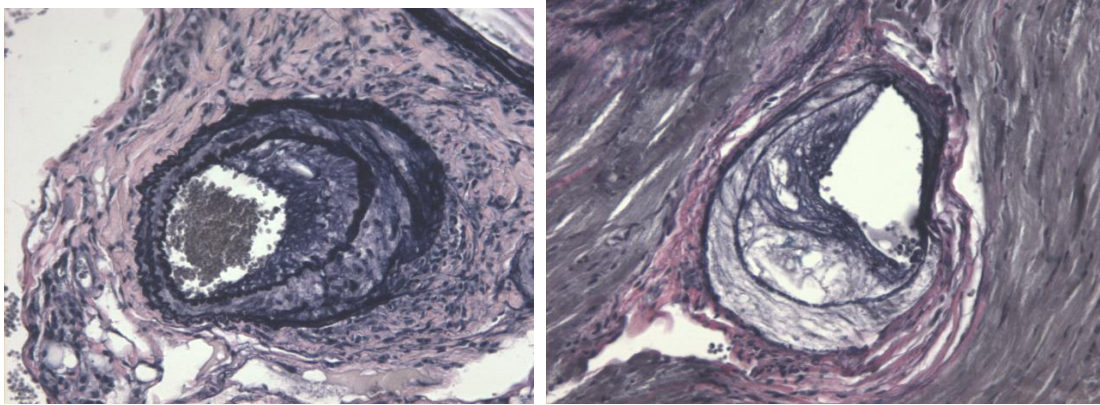


Abbildung 22: Repräsentative Abbildung arteriosklerotischer Plaques innerhalb der Koronararterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt sind die Plaques einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in 200facher Vergrößerung in Verhoeff's Elastikafärbung.

Die Analyse der Plaquegröße wird in **Abbildung 23** gezeigt:

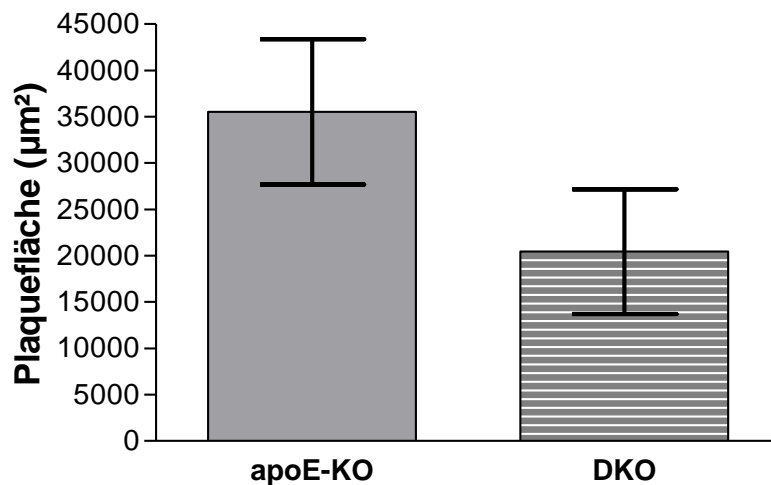


Abbildung 23: Zusammenfassende Darstellung der Gesamtfläche arteriosklerotischer Plaques in den Koronararterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp.

Die Größe der arteriosklerotischen Plaques in den Koronararterien der Doppelknockoutmäuse ($20.440 \pm 6727 \mu\text{m}^2$) unterschied sich nicht signifikant von der der apoE-KO-Mäuse ($35.530 \pm 7849 \mu\text{m}^2$), war aber tendenziell etwas verringert.

Die Verlegung des Lumens der Koronararterien wurde in Prozent angegeben und zwischen den Genotypen verglichen, wie in **Abbildung 24** gezeigt:

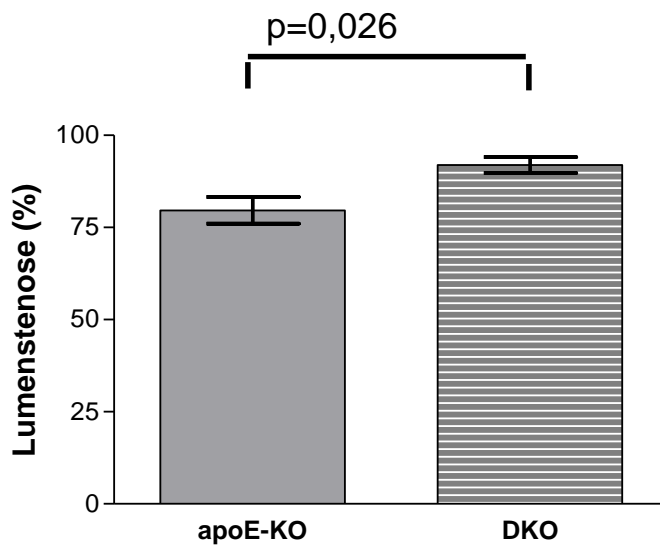


Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung der Lumenstenose in den Koronararterien 12 Monate alter Mäuse .

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp, sowie die zugehörige statistische Analyse.

Die Lumenstenose war mit $92,0 \pm 2,2 \%$ bei den Doppelknockoutmäusen signifikant erhöht gegenüber den apoE-KO-Mäusen mit $80,0 \pm 3,6 \%$ ($p = 0,026$).

Die Fläche der Media wurde in den arteriosklerotischen Koronararterien ebenfalls analysiert und in **Abbildung 25** graphisch dargestellt:

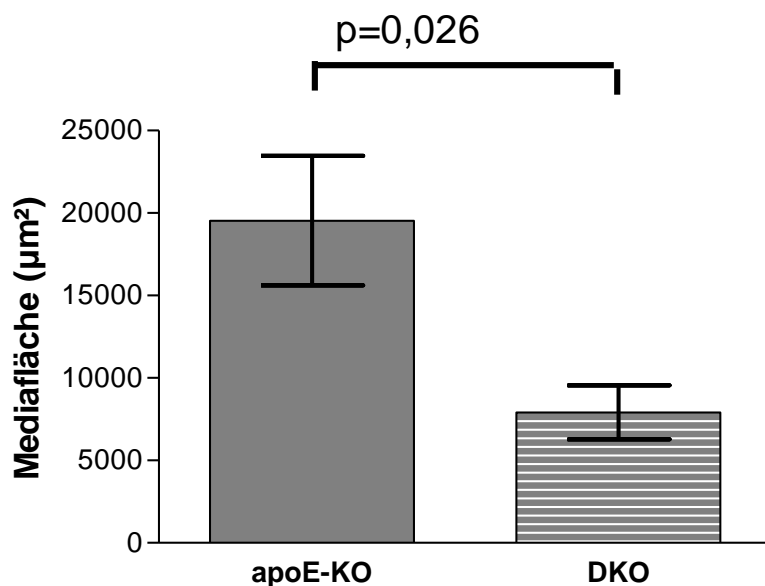


Abbildung 25: Zusammenfassende Darstellung der Mediafläche in den Koronararterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp sowie die zugehörige statistische Analyse.

Die Mediafläche der Doppelknockoutmäuse ($7.915 \pm 1.637 \mu\text{m}^2$) war gegenüber der der apoE-KO-Mäuse ($19.540 \pm 3.932 \mu\text{m}^2$) signifikant verringert ($p = 0,026$). Für das Intima-Media-Verhältnis ergab sich dagegen kein signifikanter Unterschied, wie in **Abbildung 26** angegeben.

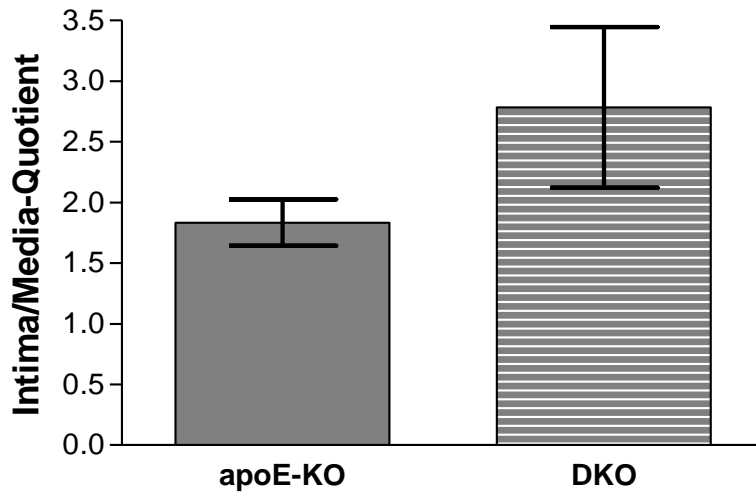


Abbildung 26: Zusammenfassende Darstellung des Intima-Media-Quotienten in den Koronararterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt ist der Mittelwert sowie der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp.

Der Intima-Media-Quotient betrug $1,83 \pm 0,19$ für die apoE-KO-Mäuse sowie $2,78 \pm 0,66$ für die DKO-Mäuse. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen.

Als Gefäßgesamtfläche der Koronararterien wurde die Fläche innerhalb der *Lamina elastica externa* vermessen und dargestellt, wie **Abbildung 27** demonstriert:

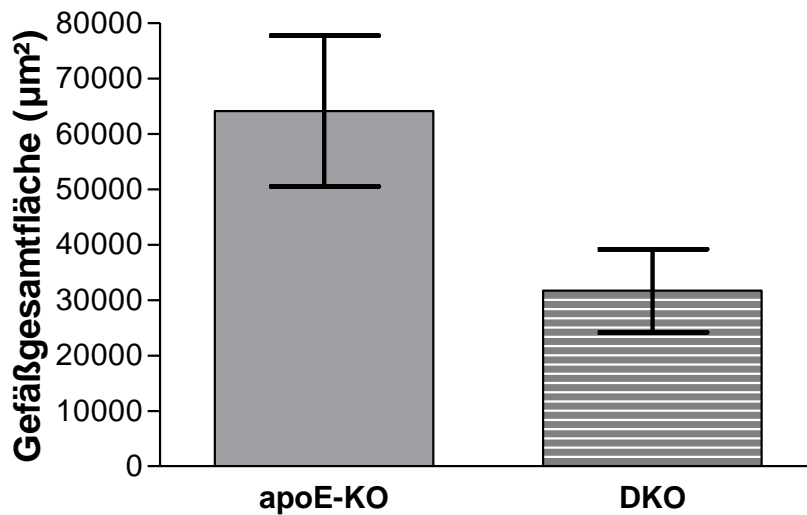


Abbildung 27: Darstellung der Gefäßgesamtfläche in den Koronararterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt ist der Mittelwert sowie der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp.

Die Gefäßgesamtfläche betrug bei den apoE-KO-Mäusen $64.100 \pm 13.630 \mu\text{m}^2$, bei den DKO-Mäusen $31.680 \pm 16.340 \mu\text{m}^2$.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

In der α -Aktin-Färbung zeigten die Plaques der Koronararterien die auch für menschliche arteriosklerotische Läsionen typische Ansammlung von glatten Muskelzellen in den Kappen der Plaque. Repräsentative Schnitte zeigt **Abbildung 28**, die zugehörige morphometrische Analyse zeigt **Abbildung 29**:

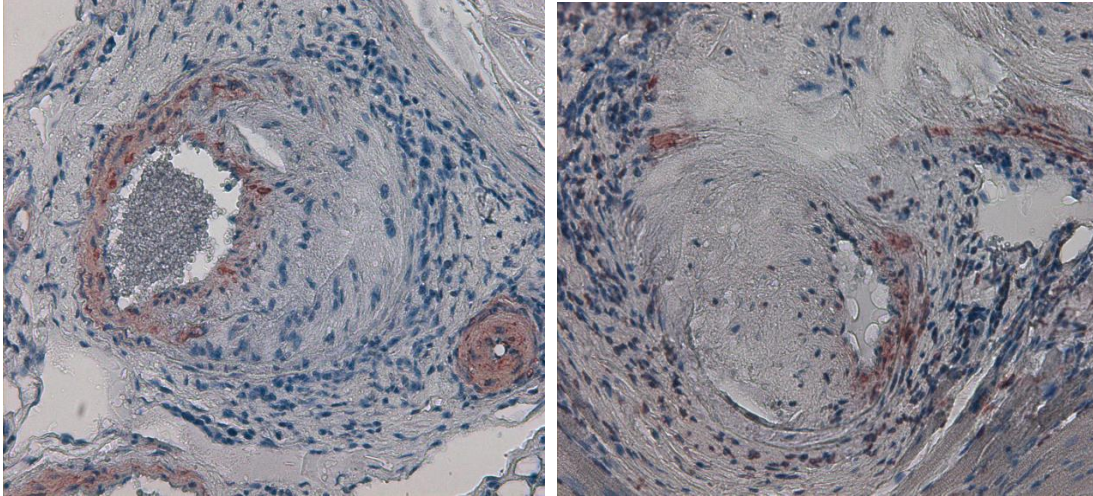


Abbildung 28: Repräsentative Bilder nach immunhistochemischer Anfärbung von α -Aktin in arteriosklerotischen Plaques der Koronararterien 12 Monate alter Mäuse

Dargestellt sind die Koronararterie einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in 200facher Vergrößerung.

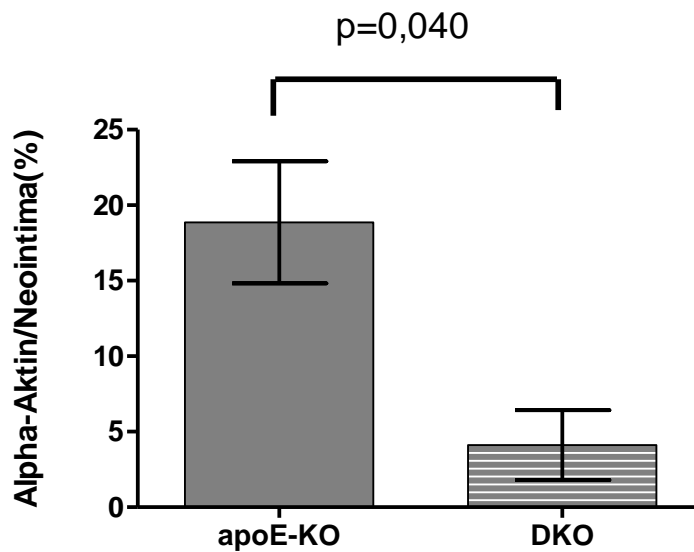


Abbildung 29: Zusammenfassende Darstellung der α -Aktin-positiven Flächen arteriosklerotischer Koronarplaques.

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp, sowie die zugehörige statistische Analyse.

Mittels quantitativer Analyse ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen bezüglich des α -Aktin-Gehaltes nachweisen ($p=0,040$).

Der immunhistochemisch nachgewiesene Gehalt an Fibrin und Fibrinogen wird in **Abbildung 30** dargestellt:

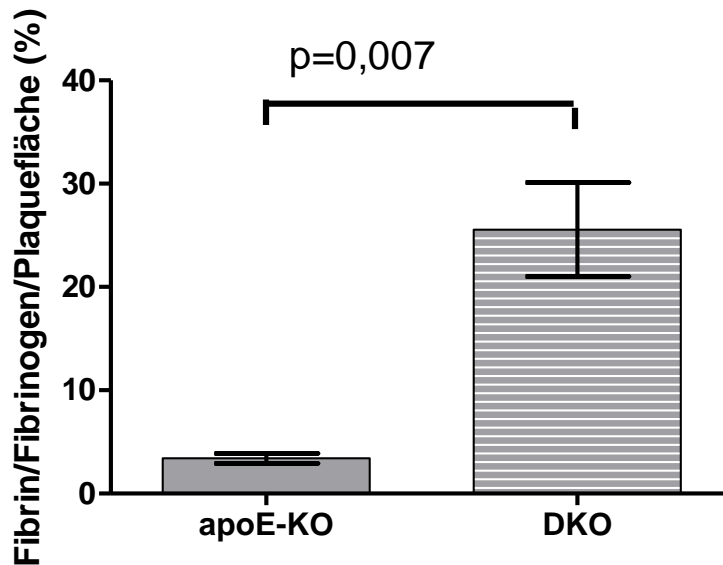


Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der Fibrin- und Fibrinogen-positiven Flächen arteriosklerotischer Koronarplaques.

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp, sowie die zugehörige statistische Analyse.

Der Fibrin- und Fibrinogengehalt war signifikant Größer bei Doppelknockoutmäusen im Vergleich zu den apoE-KO-Mäusen ($25,9 \pm 4,5$ gegenüber $3,4 \pm 0,5$ % der Gesamtfläche der Läsion; $p = 0,007$).

Die Zellularität der koronaren Plaques ist in **Abbildung 31** dargestellt:

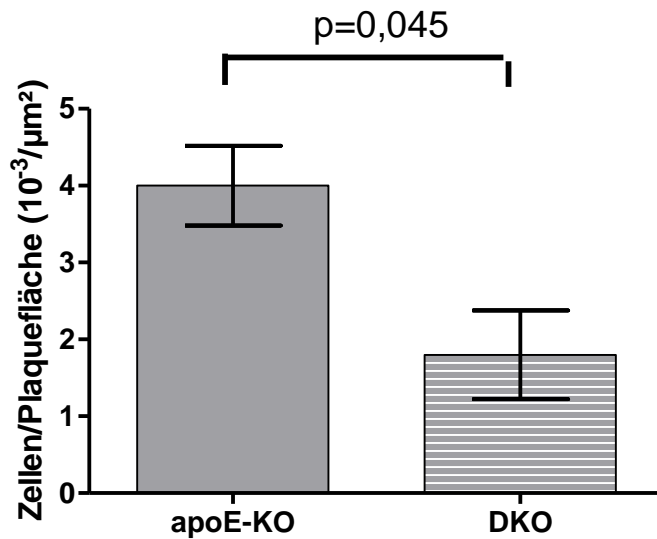


Abbildung 31: Zusammenfassende Darstellung der Zellularität arteriosklerotischer Koronarplaques.

Dargestellt sind der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp, sowie die zugehörige statistische Analyse.

Die koronaren Plaques von Doppelknockoutmäusen waren außerdem durch eine niedrigere Zellularität charakterisiert ($1,8 \pm 0,5$ gegenüber von $4,0 \pm 0,6 \times 10^{-3}$ Zellen pro μm^2 bei apoE-KO Mäusen; $p = 0,045$).

Zusammenfassend zeigen die spontanen atherosklerotischen Plaques der Coronararterien der Doppelknockoutmäuse eine größere Stenosierung des Gefäßlumens, eine kleinere Mediafläche, einen niedrigeren Anteil an α -Aktin-positiven glatten Muskelzellen, einen höheren Anteil an Fibrin und Fibrinogen sowie eine geringere Zellularität als die apoE-KO-Kontrollen.

3.2.3 Einfluss von Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und Zusammensetzung arteriosklerotischer Gefäßläsionen der Brachiozephalarterien

In den **Brachiozephalarterien** sowohl der apoE-KO- als auch der DKO-Mäuse bildeten sich spontan ebenfalls arteriosklerotische Plaques nach 12 Monaten. Repräsentative Beispiele sind in **Abbildung 32** dargestellt:

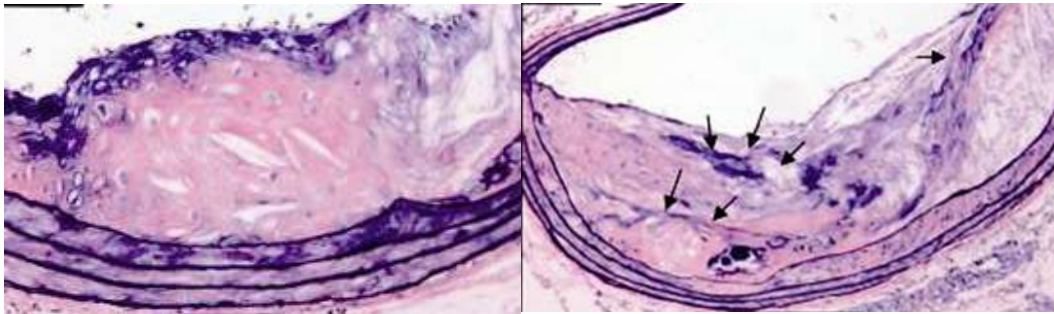


Abbildung 32: Repräsentative Abbildung arteriosklerotischer Plaques an der A. brachiocephalica 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt sind die Plaques einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in 200facher Vergrößerung (links) bzw. 100facher Vergrößerung (rechts). Verhoeff's Elastikafärbung. Die Pfeile im rechten Bild weisen auf fibröse Kappen innerhalb der Neointima hin.

Die Ergebnisse der morphometrischen Analyse der Plaqueflächen wird in **Abbildung 33** dargestellt:

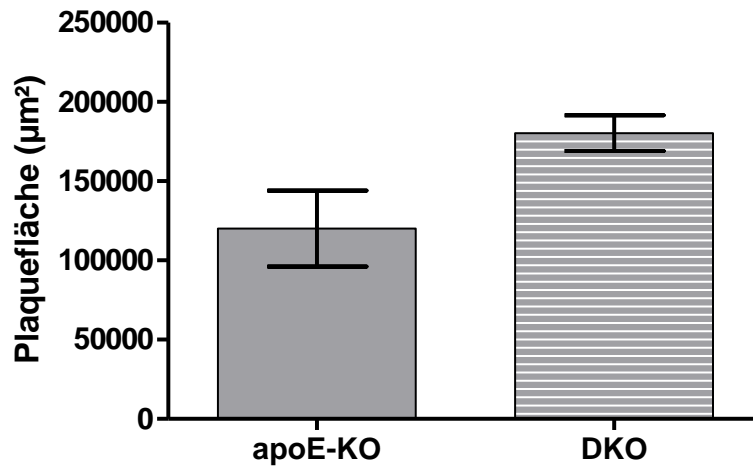


Abbildung 33: Darstellung der Plaquesfläche in den Brachiozephalarterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt werden der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp.

Auf der Ebene der Brachiozephalarterie betrug die mittlere Plaquesfläche $180.351 \pm 11.264 \mu\text{m}^2$ bei Doppelknockoutmäusen im Vergleich zu $120.114 \pm 23.960 \mu\text{m}^2$ bei apoE-KO Mäusen. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.

Die Lumenstenose wird für die Brachiozephalarterien in **Abbildung 34** dargestellt:

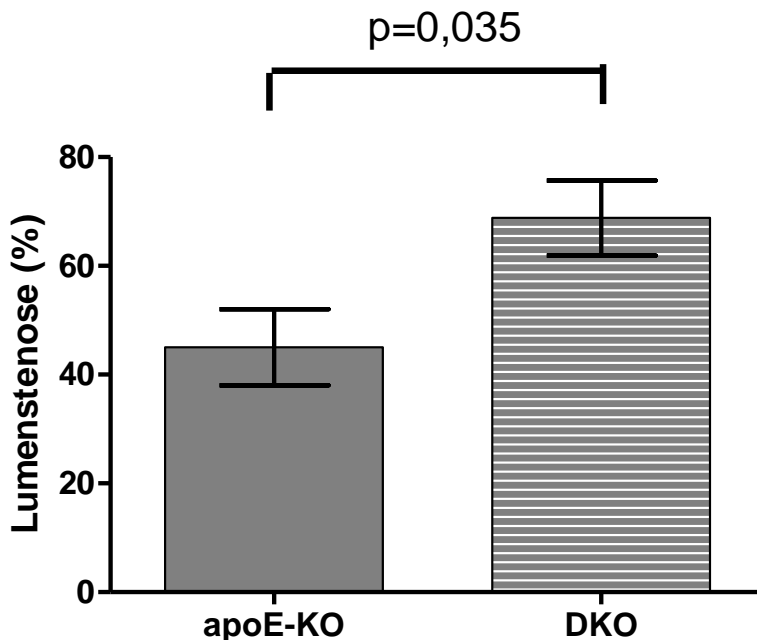


Abbildung 34: Darstellung der Lumenstenose in den Brachiozephalarterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt werden der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse.

Eine größere Lumenstenose wurde in der Abwesenheit von Urokinase-Plasminogen-Aktivator beobachtet ($67 \pm 3,0$ % gegenüber von 45 ± 7 %; $p = 0,035$).

Wie auch bei der Aortenwurzel zeichneten sich die brachiozephalen Plaques von Doppelknockoutmäusen nicht durch eine signifikante Reduktion der Zellularität aus, obwohl eine Tendenz zu einer niedrigeren Zellzahl zu beobachten war ($1,7 \pm 0,4 \times 10^{-3}$ Zellen pro μm^2 gegenüber von $3,4 \pm 1,4 \times 10^{-3}$ Zellen pro μm^2 bei $p = 0,39$), nicht gezeigt. Die α -Aktin immunpositive Fläche war jedoch in den DKO reduziert. Eine beispielhafte immunhistochemische Färbung für α -Aktin in dieser Lokalisation veranschaulicht **Abbildung 35**, die Mittelwerte und statistische Analyse zeigt **Abbildung 36**:

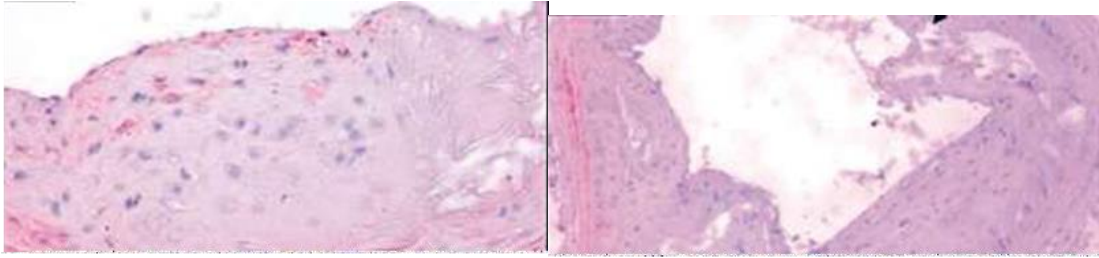


Abbildung 35: Repräsentative Abbildung arteriosklerotischer Plaques in der A. brachiocephalica 12 Monate alter Mäuse nach immunhistochemischer Färbung für α -Aktin.

Darstellung eines arteriosklerotischen Plaques in der A. brachiocephalica einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in 200facher Vergrößerung (links) sowie 100facher Vergrößerung (rechts).

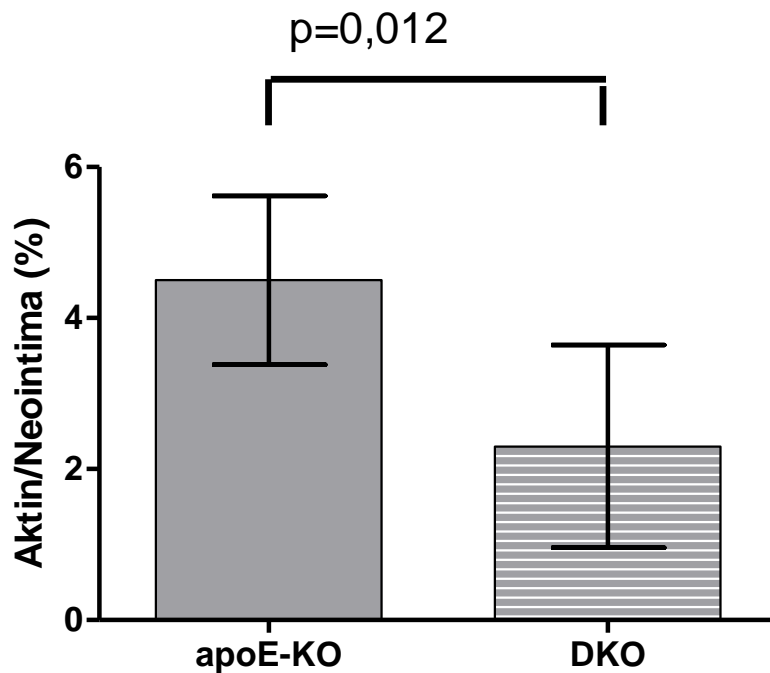


Abbildung 36: Darstellung der α -Aktin-positiven Fläche in den Brachiocephalararterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt werden der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse.

Es zeigte sich, dass brachiozephalere Plaques der Doppelknockoutmäuse eine reduzierte α -Aktin immunpositive Fläche aufwiesen ($2,3 \pm 0,6$ gegenüber von $4,5 \pm 0,5$ %; $p = 0,012$).

Da eine höhere Plaquestabilität mit hohem Gehalt an Kollagen und glatten Muskelzellen assoziiert ist, und ein funktioneller Zusammenhang zwischen Migration von glatten Muskelzellen und Kollagensynthese besteht (Rocknick, 1998), wurde ebenfalls eine Kollagenbestimmung mittels Siriusrot-Polarisationsmikroskopie durchgeführt. Diese ergab in Übereinstimmung mit den obigen Befunden eine 2,6-fache Reduktion des interstitiellen Kollagengehaltes bei Plaques von Doppelknockoutmäusen im Vergleich zu denen von apoE-KO Mäusen ($P = 0,009$), wie in **Abbildung 37** gezeigt.

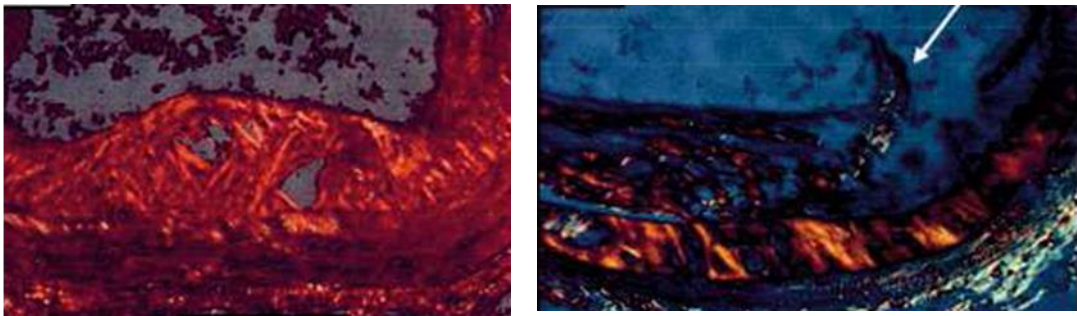


Abbildung 37: Repräsentative Abbildung nach Picrosiriusrotfärbung einer arteriosklerotischen Plaque in der A. brachiocephalica 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt sind die Plaque einer apoE-KO-Maus (links) sowie einer DKO-Maus (rechts) in 200facher Vergrößerung (Picrosiriusrotfärbung, Polarisationsmikroskopie). Pfeil: interstitielles Kollagen.

Wenn man sowohl apoE-KO-Mäuse als auch die DKO-Mäuse innerhalb des gleichen Genotyps analysiert, besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen dem α -Aktin- und dem Kollagengehalt der arteriosklerotischen Läsionen ($r = 0,554$ bei $p < 0,05$).

Darüber hinaus zeigte sich, dass, wie auch bereits an den anderen untersuchten Lokalisationen, ein Mangel an Urokinase-Plasminogen-Aktivator mit einer vermehrten Akkumulation von Fibrin und Fibrinogen in den brachiozephalen Läsionen assoziiert war. Dies wird in **Abbildung 38** illustriert.

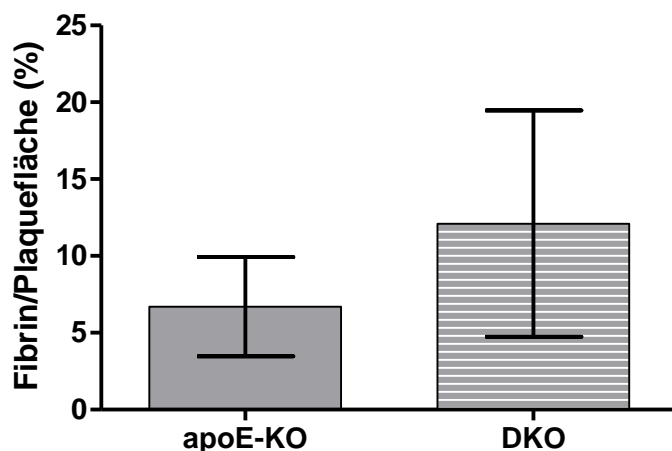


Abbildung 38: Darstellung der Fibrin- und Fibrinogen-positiven Fläche in den Brachiozephalarterien 12 Monate alter Mäuse.

Dargestellt werden der Mittelwert und der mittlere Standardfehler abhängig vom Genotyp.

Es ergab sich eine $12,1 \pm 7,4$ % immunpositiven Fläche pro Plaquesgesamtfläche bei den DKO-Mäusen im Vergleich zu $6,7 \pm 3,2$ % bei apoE-KO Mäusen, $p = 0,045$). Die Analyse von seriellen Schnitten von apoE-KO und Doppelknockoutmäusen ergab außerdem eine hochsignifikante negative Korrelation zwischen dem α -Aktin-Gehalt einerseits und Fibrin- und Fibrinogen-Gehalt andererseits ($r = -0,791$ bei $p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass ein Mangel an Urokinase-Plasminogen-Aktivator den Schweregrad einer Lumenstenose von arteriosklerotischen Plaques der Brachiozephalarterien bei apoE-KO Mäusen verstärkte. Das Fehlen von Urokinase-Plasminogen-Aktivator war außerdem mit einem

reduzierten Gehalt an glatten Muskelzellen und interstitiellem Kollagen sowie einem erhöhten Gehalt an Fibrin und Fibrinogen assoziiert.

3.3 Einfluss des Urokinase-Plasminogen-Aktivators auf die Stabilität arteriosklerotischer Läsionen

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse könnte man annehmen, dass arteriosklerotische Läsionen, die in Urokinase-Plasminogen-Aktivator defizitären apoE-KO-Mäusen entstehen, eine verstärkte Vulnerabilität bezüglich einer Plaqueruptur aufweisen. Mittels der Masson's Trichromfärbung lassen sich die Stabilitätszeichen besonders gut untersuchen (vgl. **Abbildung 39**).

Ein systematischer Vergleich der histologischen Kriterien bezüglich Plaquestabilität der Brachiozephalarterie bestätigte diese Hypothese, wie **Tabelle 3** veranschaulicht.

	apoE-KO	DKO
Kappen-Neointima-Verhältnis	0,37 ± 0,05	0,21 ± 0,04 *p=0,03
Rupturen der elastischen Laminae (%)	50 % (8/16)	78 % (7/9) p=0,23
Einblutungen (%)	13 % (2/16)	67 % (6/9) *p<0,01
Zellularität	0,5 ± 0,2	1,8 ± 0,5 *p=0,02

Tabelle 3: Histologische Marker für Plaquestabilität/-instabilität arteriosklerotischer Plaques in der A. brachiocephalica

- Kappen-Neointima-Verhältnis: Fläche der Kappe/Gesamtfläche der Neointima

- *Rupturen der elastischen Laminae: Anteil der Mäuse mit mehr als 1 Ruptur der elastischen Laminae pro Schnitt an der Gesamtzahl in %*
- *Einblutungen: Anteil der Mäuse mit Einblutungen in die Plaques an der Gesamtzahl in %*
- *Zellularität: Anzahl der kernhaltigen Zellen in der Neointima/Fläche der Neointima, angegeben in 10^{-3} Zellen pro μm^2*

So bestand ein signifikant reduziertes Kappen/Intima-Verhältnis bei Doppelknockoutmäusen im Vergleich apoE-KO Mäusen. Einblutungen in die Neointima wurden bei 6 von 9 (67 %) Doppelknockoutmäusen im Vergleich zu 2 von 16 (13 %) apoE-KO Mäusen beobachtet ($p < 0,01$; Tabelle 3).

Zusätzlich wurden *buried fibrous caps*, wie in **Abbildung 32** zu sehen, signifikant häufiger in Läsionen von Doppelknockoutmäusen beobachtet ($p < 0,02$).

Außerdem zeigte sich, dass die Anzahl der Rupturen der elastischen Laminae negativ mit dem Kollagengehalt der Läsionen korrelierte ($r = -0,615$ bei $p < 0,02$). Außerdem konnte eine spontane Ruptur der fibrösen Kappen bei 3 von 9 (33 %) Doppelknockoutmäusen im Vergleich zu 1 von 12 (8 %) apoE-KO Mäusen festgestellt werden. Beispielhaft ist die spontane Plaqueruptur einer DKO-Maus in **Abbildung 39** dargestellt.

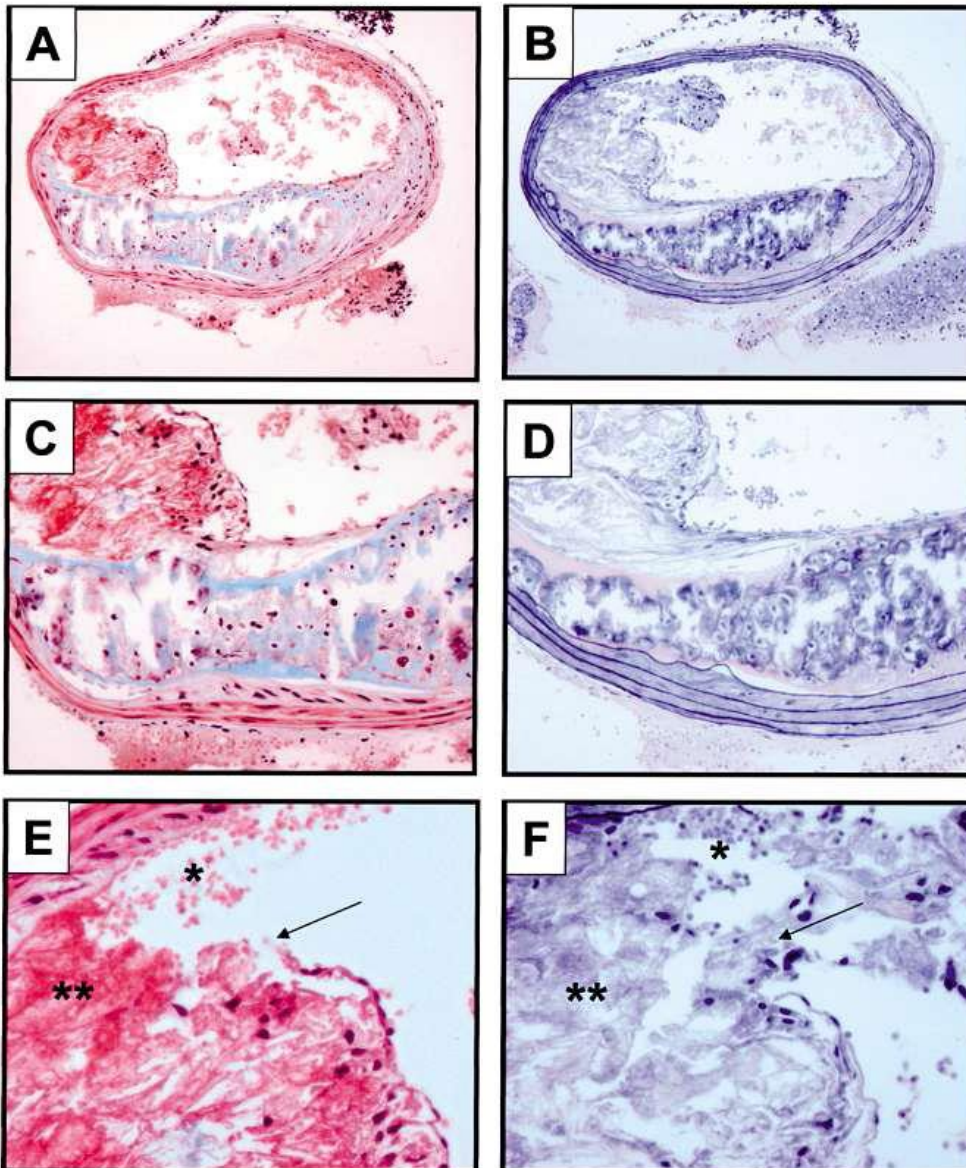


Abbildung 39: Repräsentatives Beispiel einer Plaqueruptur bei einer DKO-Maus.

Die Ruptur der fibrösen Kappe, welche die Plaque bedeckt, wurde häufiger bei DKO- als bei apoE-KO Mäusen beobachtet, was zum Einstrom von Erythrozyten (*) und thrombotischem Material (**) in die Läsion geführt haben könnte. Die linken Abbildungen zeigen eine Masson'sche Trichromfärbung, die rechten eine Verhoeff'sche Elastikafärbung. Pfeile weisen auf die unterbrochene Aussenschicht der fibrösen Kappe. Vergrößerung 100-fach (A und D), 200-fach (B und E) oder 400-fach (C und F).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde systematisch die Auswirkung eines genetischen Mangels an Urokinase-Plasminogen-Aktivator auf die Größe und zelluläre Zusammensetzung von Gefäßläsionen im Mausmodell untersucht. Wir verwendeten dabei experimentell mittels des Eisenchlorid-Modells induzierte Neointimaläsionen sowie spontan entstandene atherosklerotische Plaques in apoE-KO-Mäusen. Die Plaquegröße und Plaquezusammensetzung wurden histologisch und immunhistochemisch untersucht.

In einigen Gruppen erfolgte zusätzlich zur Untersuchung der uPA-Defizienz die Gabe von HFD. Dies erfolgte, um die Neointimabildung in der apoE-KO-Maus zu verstärken und mögliche Genotyp-abhängige Unterschiede so weiter zu unterstreichen. Die Verabreichung von HFD erhöhte sowohl in den apoE-Knockout- als auch in den Doppelknockoutmäusen die Blutfettwerte, während sich das Körpergewicht nicht signifikant veränderte. Dabei stieg das Plasmagesamtcholesterin in den Doppelknockoutmäusen etwa um das Zweieinhalbfache an, während die Plasmatriglyzeride nur leicht um etwa 20 % anstiegen (vgl. Tab. 1). Extrem hohe Plasmacholesterinlevel nach Fütterung einer HFD sind charakteristisch für die apoE-KO-Maus beschrieben (Nakashima et al., 1994).

Ein Defizit von uPA zeigte keinen Einfluss auf das Gewicht und die Blutfettwerte der apoE-Knockout-Mäuse. Ein indirekter Einfluss von uPA auf die Thromboseentstehung und Arterioskleroseentstehung über die Induktion höherer Plasmalipidlevel kann in der vorliegenden Arbeit somit ausgeschlossen werden; die Plasmalipidspiegel sind abhängig vom apoE-Genotyp und vom Futtertyp, nicht aber vom uPA-Genotyp.

4.1 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und arterielle Thrombose

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des Fehlens von uPA nach Thrombusinduktion mittels einer Endothelschädigung durch Eisenchlorid in der A. carotis von apoE-Knockoutmäusen untersucht. Ein Teil der Mäuse erhielt dazu eine HFD, ein Teil normales Nagetierfutter.

Dabei fand sich kein signifikanter Unterschied für die Mittelwerte der Thrombosezeiten zwischen den verschiedenen Gruppen (vgl. Abb.4).

In einer vorangegangenen Studie (Schäfer et al., 2002) unter Verwendung des Eisenchloridmodells wiesen die uPA-KO-Mäuse eine kürzere Thrombosezeit auf als Wildtypmäuse ($9,1 \pm 0,5$ Minuten vs. $11,1 \pm 0,4$ Minuten, $p < 0,001$). Grundsätzlich zeigen sich in der vorliegenden Studie mit $11,9 \pm 1,4$ Minuten (apoE-KO) bzw. $16,77 \pm 1,4$ Minuten (uPA-KO) vergleichbare, tendenziell aber insgesamt längere Thrombosezeiten als in der vorangegangenen Studie. Möglicherweise liefert die Methode jetzt leicht abweichende Ergebnisse aufgrund des zusätzlichen Fehlens von uPA oder Unterschieden im genetischen Hintergrund der Mäuse trotz Rückkreuzung. Denkbar ist ausserdem eine Untersucherabhängigkeit in Bezug auf die lokale Dosis des Eisenchlorids im Endothel oder andere Variablen der Operationstechnik.

Vergleichbar sind die von uns gemessenen Thrombosezeiten mit einer Studie, welche ebenfalls mittels Eisenchloridmodell den Einfluss von PAI-1 auf die arterielle Thrombose in apoE-KO-Mäusen untersuchte (Zhu et al., 2001). Mit einer cholesterinreichen Nahrung ernährte apoE-KO-Mäuse entwickelten in einem ähnlichen Zeitraum ($12,7 \pm 2,8$ min) wie in der vorliegenden Studie thrombotische Verschlüsse. Mit normalem Futter ernährte Tiere wiesen dagegen signifikante längere Zeiten bis zum thrombotischen Verschluss auf ($22,3 \pm 1,7$ Minuten). Im Gegensatz den Ergebnissen von Zhu et al. sowie zu einer früheren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe (Schäfer et al., 2003) führte die Gabe von HFD in der vorliegenden Arbeit nicht zu einer Verkürzung der Zeit von Beginn

der Applikation des Eisenchlorides bis zum vollständigen thrombotischen Verschluss der Arteria carotis.

Auch eine vorausgegangene Studie mit WT (Wildtyp) -Mäusen und apoE-KO-Mäusen konnte für beide Genotypen kein Effekt der Fütterung mit HFD auf die Thrombosezeiten nachweisen (Schäfer et al., 2003).

Bei Menschen erhöhen pathologisch erhöhte Triglyceridlevel bei bestimmten Zielgruppen bekanntermaßen das Risiko für die Entstehung von venösen Thrombosen (Doggen et al., 2004). In einer *matched pair*-Studie an Männern zeigte sich ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt bei erhöhten Plasmaspiegeln an α_2 -Antitrypsin, Plasminogen, PAI-1 und t-PA (Meltzer et al., 2010), dies war allerdings nur für α_2 -Antitrypsin unabhängig von den weiteren Risikofaktoren metabolisches Syndrom und Rauchen nachweisbar. Diese Diskrepanzen werden hauptsächlich den unterschiedlichen Verfahren zur Adjustierung von Confoundern in den einzelnen Studien zugeschrieben (Meltzer et al., 2009).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die von uns ermittelten Thrombosezeiten im in der Literatur für das gewählte Modell beschriebenen Bereich lagen. Wir konnten keine Unterschiede in den Thrombosezeiten – weder bei Abwesenheit von uPA, noch bei erhöhten Plasmalipidleveln – nachweisen.

4.2 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Fibrinolyse

In der vorliegenden Studie wurden 25 Minuten nach Thromboseinduktion sowie 3 Wochen nach Thromboseinduktion erneut der Blutfluss der A. carotis gemessen. Erwartungsgemäß waren in allen Versuchsgruppen 3 Wochen nach Thrombusinduktion weniger Gefäße vollständig verschlossen als 25 Minuten nach Thrombusinduktion.

Die Rekanalisierungsraten nach 25 Minuten unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen Genotypen, die Gabe von Fettfutter resultierte in einer tendenziellen Verringerung der Rekanalisationsraten ohne statistische Signifikanz für alle Genotypen (vgl. Abbildung 5).

Nach insgesamt 3 Wochen haben sich die Rekanalisierungsraten für alle Gruppen deutlich erhöht. Statistisch signifikante Unterschiede zeigen sich weiterhin nicht zwischen den Genotypen und den Futtertypen (vgl. Abbildung 6).

Bei den DKO-Mäusen lag die Rekanalisierungsrate nach 3 Wochen mit 69 % in einem niedrigeren Bereich als bei den apoE-KO-Mäusen (95%), aber noch etwa doppelt so hoch wie die Rekanalisierungsraten nach 25 Minuten. Das Fehlen von uPA scheint also die Rekanalisierung von Gefäßen nach Thrombose zu vermindern, aber nicht vollständig zu unterbinden.

Interessant ist, dass die Rekanalisierungsrate nach 3 Wochen für die apoE-KO+HFD-Gruppe mit 77 % in einem ähnlichen Bereich liegt wie die der DKO sowie DKO-HFD-Gruppe, aber niedriger als die der apoE-KO-Gruppe. Möglicherweise hemmt hier die cholesterinreiche Fütterung die Fibrinolyseaktivität der apoE-KO-Maus und antagonisiert so den Effekt des Vorhandenseins von uPA in diesem experimentellen Modell.

Hierfür spricht, dass in einer vorangegangenen Studie die Rekanalisierungsrate 25 Minuten nach Verletzung von apoE-KO+HFD-Mäusen mit 12 % ebenfalls sehr niedrig war (Schäfer et al., 2003). In der gleichen Studie zeigten etwa die Hälfte (51 %) der Wildtypmäuse nach 25 Minuten offene Gefäße, durch die Gabe von HFD wurde diese Rate signifikant verringert. Indem die Versuche mit sehr jungen Tieren und normalem Futter wiederholt wurden, konnte das Fehlen von apoE als wesentlicher Faktor für die arterielle Thrombose sowie persistierende Gefäßverschlüsse ausgeschlossen werden.

In der gleichen Studie werden Hinweis darauf untersucht, dass eine verstärkte Expression von PAI-1 zu einem thrombogenen Phänotyp im apoE-KO-Mausmodell führt.

Der Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 führt zu einer Hemmung des Plasminogen Aktivators, der über die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin in die Regulation des fibrinolytischen Systems eingreift. Zhu et al. konnten in einer Vergleichsstudie von apoE und PAI-1-Doppelknockoutmäusen mit apoE-KO-Mäusen unter Nutzung des Eisenchloridmodells eine erhöhte Thrombusneigung und Throm-

buspersistenz bei Vorhandensein von PAI-1 feststellen. Der Grund liegt vermutlich in der PAI-1 vermittelten Hemmung der Entfernung bzw. Auflösung von thrombozytenreichen Verschlüssen, die im Folgenden Wachstumsfaktoren an die Gefäßwandzellen aussenden (Zhu et al., 2001).

So war erwartungsgemäß auch in der vorliegenden Studie das Fehlen von uPA mit einer verschlechterten Auflösung von Thromben und konsekutiv einer höheren und persistierenden Lumenstenose assoziiert.

Ähnliche Daten konnten auch bei venösen Thrombosen im Mausmodell generiert werden: Bei uPA-KO Mäusen mit Thrombose der unteren Hohlvene ist die Thrombusauflösung und -organisation stark verlangsamt. Das Fehlen von tPA hatte dabei interessanterweise keinen Einfluss auf diese Merkmale. Nach einer Knochenmarktransplantation von Wildtypknochenmark in die uPA-defizienten Tiere verringerte sich die Größe der Thromben beträchtlich (Singh et al., 2003). TPA und uPA haben bekanntermaßen verschiedene Rollen in der vaskulären Physiologie inne. So vermittelt tPA vorwiegend die Auflösung von Fibrin im Rahmen einer Gefäßverletzung, uPA aktiviert vor allem zellgebundenes Plasminogen und induziert so eine perizelluläre Proteolyse, die in Degradation von Matrixproteinen resultiert (Lijnen, 2002).

Zusammenfassend kann also gesagt werden dass das Fehlen von uPA in der vorliegenden Studie nicht zu schlechterer Fibrinolyse im Moment der Verletzung, aber zu verschlechterter Rekanalisation von Thromben mit konsekutiv stärkerer Neointimabildung und Lumenstenose führt. Dies könnte darauf beruhen, dass uPA über die Vermittlung von Zellmigration die Entfernung von intraluminalen sowie intramuralen Thromben erleichtert (Carmeliet et al., 1998b; Lijnen et al., 1998; Deng et al., 1996; Stefansson und Lawrence, 1996).

4.3 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Neointimabildung

Wir untersuchten histologisch die Größe der Neointimaläsionen und die resultierende Stenosierung des Gefäßlumens der A. carotis 3 Wochen nach Gefäßverletzung mit Hilfe des Eisenchloridmodell.

Dabei entwickelten die mit Standardfutter gefütterten Mäuse DKO-Mäuse eine signifikant stärkere Lumenstenose gegenüber den mit Standardfutter gefütterten apoE-KO-Mäusen (vgl. Abbildung 6 und 7). Es liegt also nahe, dass in unserem Modell das Fehlen von uPA als eigenständiger Faktor die intimale Hyperplasie verstärkt. Dieser Effekt scheint unabhängig vom weiteren genetischen Hintergrund aufzutreten und nur teilweise additiv zu weiteren Risikofaktoren (apoE-KO, HFD) zu sein.

Desweiteren konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Abwesenheit von uPA im Rahmen des vaskulären Remodellings mit einer signifikant kleineren Mediafläche einhergeht. Dieser Effekt zeigte sich unabhängig vom Futter.

Ausserdem zeigten wir, dass die Gefäßgesamtflächen von DKO-Mäusen signifikant kleiner sind als die von apoE-KO-Mäusen. Bei Zugabe von Fettfutter war der Effekt noch tendenziell vorhanden, aber nicht mehr statistisch signifikant.

Unsere Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Mausstudien, in denen arterielle Gefäße mechanisch oder elektrisch geschädigt wurden, um eine Neointimabildung zu erzeugen und in denen bei uPA-Defizienz eine geringere Neointimabildung und geringere Lumenstenose beobachtet wurde (Carmeliet et al., 1997a; Stefansson und Lawrence, 1996). Dieser Unterschied ist möglicherweise durch das verwendete Modell zur Thromboseinduktion erklärbar, in beiden genannten Modellen war der Endpunkt Thrombose keine beständige Größe, während das von uns verwendete Eisenchlorid-Modell durch die Schädigung des Endothels und der Medialschicht der Arterienwand charakterisiert ist. Hervorzuheben ist die daraus resultierende reproduzierbare Formation von okklusiven thrombozytenreichen Thromben, die sich über einen Zeitraum von drei Wochen schrittweise

auflösen bzw. organisieren (Konstantinides et al., 2001; Farrehi et al., 1998). Es ist von Wichtigkeit, die Kinetik der intravaskulären Thrombenentstehung, seine Organisation und Auflösung als einen Teil des vaskulären Remodellingprozesses mit einzubeziehen (Schäfer et al., 2002). In der Studie von Carmeliet et al. zeigten die uPA-defizienten Mäuse nach elektrischer Endothelverletzung eine Akkumulation der glatten Muskelzellen an den Rändern der Gefäßverletzung (Carmeliet et al., 1997a), aber eine fehlende Einwanderung in das nekrotische Zentrum. Übereinstimmend wurde eine reduzierte Migration von SMCs in die Neointima auch in dieser Studie beobachtet, was bei uns in einer weitgehenden Persistenz der thrombotischen Lumenverlegung resultierte.

Weitere Studien belegen, dass es - je nach gewähltem Modell und Lokalisation der Neointimainduktion - scheinbar widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Größe der resultierenden Neointima auch bei anderen Faktoren des fibrinolytischen Systems geben kann. So fanden Zhu et al. eine reduzierte Neointimabildung von PAI-1-Knockoutmäusen (Zhu et al., 2001), während die Gruppe um Carmeliet eine stärkere Neointimabildung nachweisen konnte (Carmeliet et al., 1997c). Ausserdem scheint PAI-1 die Neointimabildung in der A. carotis nach Thrombusinduktion durch photochemischen Endothelschaden zu verstärken (Eitzman et al., 2000). Dass von Neointimabildung nicht automatisch auf Atheroskleroseentstehung geschlossen werden kann, wird in der gleichen Studie ebenfalls belegt: apoE-KO-Mäuse entwickelten ähnliche atherosklerotische Läsionen des Aortenbogens in Abwesenheit wie in Anwesenheit des PAI-1-Gens.

Beim Menschen vergrößern sich im Rahmen des vaskulären Remodelling als Reaktion des Gefäßes auf einen pathologischen Reiz Intima (*inward remodelling*), Media und Gefäßgesamtgröße (*outward remodelling*). In vielen Situationen werden vergrößerte Gefäßgesamtdurchmesser durch intraluminale Stenosen bedingt und dienen als Kompensationsmechanismus zur Reduktion von *shear stress* (Tronc et al., 1996). In menschlichen Koronararterien ist die Intima-Media-Dicke (*intima media thickness; IMT*) mit kompensatorischem *outward remodelling* assoziiert (Korshunov und Berk, 2003).

In der vorliegenden Studie wiesen auch die Koronararterien der untersuchten Mäuse bei Fehlen des uPA-Gens einen signifikant kleineren Gefäßdurchmesser auf. Dieses Ergebnis stimmt mit unseren Beobachtungen bei den artefiziell erzeugten Gefäßläsionen der Aa. Carotes überein und steht überdies im Einklang mit weiteren Studien, die einen Beitrag von uPA zum *outward remodelling* von Gefäßen nahelegen; so wurde uPA ebenfalls mit der Entstehung von Aneurysmata und Plaquerupturen in Verbindung gebracht.

In einer experimentellen Studie bei hypercholesterinämischen apoE-KO-Mäusen wurden durch Gabe von Angiotensin II die Entstehung von Bauchortenaneurysmata regelhaft induziert; Im Genotyp apoE-KO und uPA-KO kam es unter den gleichen Versuchsbedingungen zu signifikant geringerer Aneurysmabildung (Deng et al., 2003).

In acht Patienten mit Aneurysma wurde mittels *in situ* Hybridisierung die Expression von fibrinolytischen Genen untersucht. Alle Gewebeproben zeigten spezifische Entzündungsherde, die von Makrophagen infiltriert waren, welche vermehrt uPA exprimierten (Schneidermann et al., 1995).

Im Mausmodell sind die vaskulären Remodellingprozesse aber nicht vollständig mit denen im Menschen vergleichbar. So zeigt sich bei kompletter Unterbrechung des Blutflusses in Mäusen durch Ligation der A. carotis eine Verringerung des Gefäßgesamtdurchmessers sowie eine Vergrößerung der Mediafläche (Kumar und Lindner, 1997). Dieses Remodelling wurde kürzlich mit erhöhter Expression von Matrix-Metalloproteinasen in den Gefäßen sowie ansteigenden Zellzahlen assoziiert (Godin et al., 2012). Sowohl die Migration von Zellen als auch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen ist von uPA abhängig und fehlt daher bei uPA-KO-Mäusen weitgehend, was die oben dargestellten Ergebnisse erklärt.

Neben den beschriebenen Effekten durch uPA-Knockout zeigt sich in der vorliegenden Studie ausserdem ein Effekt der HFD auf die Neointimabildung bzw. die resultierende Lumenstenose. Dieser war besonders deutlich beim apoE-Genotyp

ausgeprägt. Die ohnehin vermehrte Lumenstenose der DKO-Mäuse wurde durch die HFD nicht weiter verstärkt.

Die cholesterinreich ernährten apoE-KO-Mäuse der Gruppe von Zhu et al. zeigten ebenfalls ein verstärktes neointimales Wachstum gegenüber apoE-KO-Mäusen mit normalem Futter, während WT-Kontrolltiere kein Neointimawachstum entwickelten. Die Ergebnisse von Zhu et al. sowie unsere eigenen deuten darauf hin, dass neben einer arteriellen Verletzung ein gestörter Lipidstoffwechsel eine intimale Hyperplasie verstärkt (Zhu et al., 2001).

4.4 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Arteriosklerose

Thrombose ist ein kritisches Ereignis in der Pathophysiologie der menschlichen Arteriosklerose (Virmani et al., 2000; Libby, 2001) und die komplexen Interaktionen zwischen Thrombozyten, Gerinnungs- und fibrinolytischen Faktoren sowie Zellen der Gefäßwand selbst und deren Organisation spielen eine ausschlaggebende Rolle während der arteriosklerotischen Krankheitsentwicklung (Libby, 2001; Phipps, 2000).

Deshalb wurden in dieser Arbeit zusätzlich zu experimentell erzeugten Neointimalasionen auch spontan entstandene arteriosklerotische Plaques der Koronararterien, der Aortenwurzel und der A. brachiocephalica 12 Monate alter apoE-KO Mäuse untersucht.

In den Koronararterien war das Fehlen des uPA-Gens mit einer vergrößerten Neointimafläche sowie einer schwerwiegenderen Lumenstenose assoziiert. Die Mediafläche sowie die Gefäßgesamtfläche der koronaren Plaques war hingegen in den DKO-Mäusen deutlich kleiner als in den apoE-defizienten Kontrolltieren. Des Weiteren waren die koronaren Plaques der DKO-Mäuse von einer geringeren Zellularität. Diese Plaques wiesen außerdem weniger α -Aktin positive glatte Muskelzellen und einen erhöhten Gehalt an Fibrin und Fibrinogen auf.

Die Plaques der Aortenwurzel zeigten keine signifikanten Größenunterschiede, keine Unterschiede in der Zellularität und keine Unterschiede in der Zahl der α -

Aktin-positiven Muskelzellen, die insgesamt sehr niedrig war. Der Fibrin- und Fibrinogengehalt war für den DKO-Genotyp gegenüber dem apoE-KO-Genotyp signifikant erhöht.

Die Flächen der Plaques in der Brachiozephalarterie der Doppelknockoutmäuse waren im Vergleich zu apoE-KO-Mäusen etwa eineinhalbfach vergrößert und es zeigte sich eine höhergradige Lumenstenose. Auch hier zeigt sich eine reduzierte Zahl α -Aktin positiver glatter Muskelzellen, einer reduzierter Kollagengehalt sowie ein erhöhter Gehalt an Fibrin und Fibrinogen.

Die Bedeutung von uPA für die Pathogenese der Arteriosklerose ist kontrovers. Sowohl uPA-RNA als auch PAI-1-RNA konnten in arteriosklerotischen Läsionen von apoE-KO-Mäusen mittels in-situ-Hybridisierung in SMCs und Makrophagen nachgewiesen werden, während diese Zellen in gesunden Gefäßabschnitten kaum RNA von uPA und PAI-1 aufwiesen (Xiao et al., 1997). Dies weist auf die Bedeutung des Fibrin- und Fibrinogensystems bzw. des Plasmin und Plasminogensystems für die Arteriogenese hin. Die gleiche Studie zeigte, dass in apoE-KO-Mäusen das Fehlen des Plasminogens die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques begünstigt, so dass für das Fehlen von uPA ebenfalls ein proarteriogener Effekt vermutet werden kann. Diese Hypothese wird durch die vorliegenden Daten gestützt.

Im Gegensatz dazu zeigten apoE-KO-Mäuse, deren Makrophagen uPA überexprimierten, ebenfalls eine verstärkte Entstehung arteriosklerotischer Läsionen an der Aortenwurzel sowie eine Dilatation des Aortenwurzelbereiches (Kremen et al., 2008, Cozen et al., 2004).

Die Transplantation von Knochenmarksstammzellen uPA-überexprimierender Mäuse in apoE-KO-Mäuse resultierte in signifikant vergrößerten Plaques der Aorta und der Aortenwurzel im Vergleich zu einer Transplantation mit Knochenmarksstammzellen von uPA-Wildtyp-Mäusen. Bei dieser Studie ließ sich in den Makrophagen der Neointima einer signifikante höhere uPA-Expression nachweisen (Krishnan et al., 2009). In der gleichen Arbeit führte die Transplantation von

uPA-KO-Knochenmark in uPA-Wildtyp- und apoE-KO-Mäuse zu einer Reduktion der Atherosklerose in der Aorta.

Eine weitere Studie konnte in transgen uPA-überexprimierenden Gefäßen von Kaninchen eine Gefäßkonstriktion sowie eine erhöhte Lumenstenose zeigen (Falkenberg et al., 2002). Die Überexpression von Urokinase-Plasminogen-Aktivator war mit einem Verlust an Lumenfläche von etwa 44 % und einer starken Verengung der Arterie assoziiert. Passend zu den von uns vorgelegten Daten war die Media bei uPA-Überexpression verdickt.

In einer Studie an humanen Koronararterien wurde eine Korrelation zwischen der Expression von uPA und dem Vorliegen und Schwere von arteriosklerotischen Läsionen ermittelt. Das Vorliegen eines kausalen Zusammenhanges kann daraus aber nicht abgeleitet werden (Kienast et al., 1998).

Von besonderer Bedeutung scheint bei der Pathogenese der Arteriosklerose das lokale Expressionsmuster der verschiedenen Plasminogen-Aktivatoren zu sein. Eine quantitative Analyse von uPA und Plasminogen konnte zeigen, dass das uPA-Antigen in der Intima der arteriosklerotischen Läsionen verstärkt exprimiert wurde. Eine Enzymaktivität in intimalen oder medialen Extrakten konnte in diesem Zusammenhang nicht detektiert werden. Da ein Überschuss an PAI-1 in den intimalen Schichten arteriosklerotische Läsionen der menschlichen Aorta charakterisiert, scheint die Plasminogen-Aktivator-Aktivität durch eine verstärkte PAI-1 Expression und Akkumulation lokal begrenzt beziehungsweise mindestens teilweise antagonisiert zu sein (Padro et al., 1995).

In einer entsprechenden Studie konnte gezeigt werden, dass apoE- und Plasminogen-KO-DKO größere Plaques im Aortenbogen entwickelten als die apoE-KO-Kontrollgruppe. Diese Plaques waren sehr schaumzellreich und vor allem im Bereich der kleineren Biegung des Aortenbogens und der proximalen Aorta lokalisiert (Xiao et al., 1997).

In einer weiteren Studie wurde die uPA-Expression in arteriosklerotischen menschlichen Läsionen untersucht (Lupu et al., 1995). Auf drei Ebenen wurde die uPA-Expression analysiert: mRNA, Protein sowie Enzymaktivität. Es zeigte sich, dass uPA vor allem in Makrophagen und glatten Muskelzellen innerhalb der menschlichen arteriosklerotischen Läsionen nachweisbar ist. Ein Beitrag zur Pathogenese der Arteriosklerose wird diskutiert, da bis zu zwei- bis fünffach erhöhte uPA-Spiegel in menschlichen arteriosklerotischen Arterien ermittelt wurden. Lokale uPA-Spiegel scheinen mit der Schwere der Krankheit zu korrelieren (Padro et al., 1995; Lupu et al., 1995; Kienast et al., 1998; Falkenberg et al., 1998).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl in humanen als auch tierexperimentellen Studien Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Arterioskleroseentstehung und der uPA-Expression existieren. In humanen arteriosklerotischen Läsionen ist ein erhöhtes Vorkommen von uPA nachgewiesen worden, welches aber möglicherweise funktionell durch eine ebenfalls erhöhte PAI-1-Expression antagonisiert wird. Sowohl eine genetische Überexpression von uPA als auch, wie in unserer Studie, ein Fehlen des uPA-Gens wurden in tierexperimentellen Studien mit vermehrter Intimaproliferation in Verbindung gebracht.

4.5 Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Plaqueinstabilität

So widersprüchlich die bisherigen Studien die quantitative Beeinflussung der Entstehung arteriosklerotischer Plaques durch uPA charakterisieren, so deutlich weisen die Ergebnisse einer Vielzahl von Studien auf einen signifikanten Beitrag von uPA zum Stabilitätserhalt von Plaques sowie zum vaskulären Remodelling hin.

Ein Mangel an Urokinase-Plasminogen-Aktivator ist in der vorliegenden Studie mit einer deutlichen Reduktion der Zellularität der Läsion assoziiert; dies galt sowohl für die experimentell erzeugten als auch für die spontanen atherosklerotischen Läsionen. Die Zellularität der untersuchten arteriosklerotischen Plaques unterschied sich nur signifikant für die Plaques der Koronararterien; die Zellulari-

tät der Aortenwurzelläsionen und der *A. brachiocephalica* war bei den beiden Genotypen nicht-signifikant unterschiedlich.

Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse einer vorangegangenen Arbeit aus der gleichen Arbeitsgruppe, in der nach Eisenchlorid-induzierter Thrombose uPA-KO-Mäuse ca. 65 % weniger Zellen in der Neointima aufwiesen als Wildtypmäuse. Nur knapp 5 % Zellen wurden in der Media ermittelt (Schäfer et al., 2002).

Zellen innerhalb atherosklerotischer Plaques sind hauptsächlich glatte Muskelzellen sowie Makrophagen, letztere wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Der Anteil an SMCs wurde mittels der spezifischen Färbung für α -Aktin ermittelt. Auch hier ergibt sich sowohl bei den experimentell erzeugten Läsionen als auch bei den arteriosklerotischen Läsionen ein verringerter Anteil bei Fehlen von uPA. In Bezug auf die im Mausmodell besonders rupturgefährdeten Plaques der *A. brachiocephalica* wurde die α -Aktin immunpositive Fläche in Korrelation zu dem Kollagengehalt untersucht. Es konnte eine positive Korrelation zwischen dem α -Aktin und dem Kollagengehalt ermittelt werden.

Die glatten Muskelzellen sind die hauptsächlichen Produzenten von Kollagen, welches für die Stabilisierung der Kappe verantwortlich ist. Der Verlust dieser wichtigen Zellen zieht sowohl eine Schwächung der Kappen als auch den Verlust der extrazellulären Matrixintegrität nach sich und ist daher ein entscheidender Faktor hinsichtlich der Plaquevulnerabilität (Libby, 2001; Cullen P et al., 2003).

In den von uns untersuchten Läsionen zeigt sich das Fehlen des uPA-Genotyps durchweg mit einem erhöhten Anteil von Fibrin und Fibrinogen assoziiert. In den experimentell erzeugten Läsionen zeigt sich dieser Unterschied besonders ausgeprägt, aber auch für spontane arteriosklerotische Läsionen der Aortenwurzel, der Koronararterien sowie der *A. brachiocephalica* ist er signifikant. In den arteriosklerotischen Läsionen der *A. brachiocephalica* zeigt sich darüberhinaus auch eine negative Korrelation zwischen dem Gehalt an α -Aktin und dem an Fibrin/Fibrinogen.

Die lokale Proliferation und die Migration von glatten Muskelzellen werden als Schlüsselereignisse während der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen verstanden (Ross, 1986). Sie werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert (Ross, 1991). Das Plasminogen-Aktivator/Plasmin System reguliert durch proteolytische Aktivierung die Aktivität der Wachstumsfaktoren (Flaumenhaft et al., 1993). Darüber hinaus trägt es zur proteolytischen Degradierung der Extrazellulärmatrix – für welche in unserem Modell Fibrin/Fibrinogen exemplarisch bestimmt wurde - bei, welche eine Grundvoraussetzung für die Migration der glatten Muskelzellen ist (Sperti et al., 1992). Die durch uPA/uPAR vermittelte Proteolyse läuft dabei streng lokalisiert ab und ermöglicht so die Regulation der Migration von SMCs und Makrophagen in die Neointima (Fuhrman, 2012).

So ist auch *in vitro* eine verminderte Migrationsfähigkeit uPA-defizienter SMCs (Carmeliet et al., 1997a) und von Makrophagen (Krishnan et al., 2009) belegt.

Im Migrationsassay kann die Migration von SMCs in Anwesenheit von Endothelzellen durch einen gerichteten Fluss induziert werden. Dieser Effekt kann durch gezieltes Eingreifen im uPA-MMP-System verändert werden. So wird durch einen uPA-Antagonist sowie einen MMP-Antagonist die Migration der SMCs gehemmt, in PAI-1-KO-SMCs ist die Migration verstärkt (Cullen JP et al., 2004).

Carmeliet et al. konnten in ihrer Studie zur Induktion von Neointima in uPA-KO ein verringertes Wachstum von glatten Muskelzellen eine Woche und zwei Wochen nach der Läsionsinduktion zeigen. Dabei war die Proliferation der Muskelzellen in der Media in den uPA-defizienten Mäusen um fast 60 % reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Eine geringere Abnahme (ca. 14 %) konnte für die Proliferation in der Neointima gezeigt werden. Nach äußerlicher Gefäßverletzung bei Wildtypmäusen migrieren die glatten Muskelzellen innerhalb der Media und entlang des Lumens von den unverletzten Seiten in das nekrotische Zentrum. Innerhalb von 3 Wochen konnte eine deutliche Neointima durchgehend im vorher verletzten Segment detektiert werden. Im Gegensatz dazu entwickelten die uPA - KO Mäuse nur eine Neointima entlang des Verletzungsrandes. Die glatten Muskelzellen wanderten dabei nicht bis in das nekrotische Zentrum ein. tPA-

defiziente Tiere zeigten diese Effekte nicht, weswegen diese Studie den Zusammenhang zwischen der Neointimabildung und uPA deutlich macht (Carmeliet et al., 1997a). Da die Anzahl an Makrophagen, die die verletzte Stelle erreichen, unter einem uPA-Mangel vermindert war, scheint die uPA-Aktivität einen tiefen Effekt auf die Entzündungsreaktion zu haben. Dabei ist die Aufgabe der Makrophagen nicht nur die Entfernung und der Abbau von nekrotischem Gewebe, sondern auch die Erleichterung der Reparatur der Myofibrillen (Lluís et al., 2001). Die Mechanismen, die den Effekt von uPA auf das Gefäßremodelling vermitteln, umfassen sowohl die Plasminogenierung als auch die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (Carmeliet et al., 1997b). Des Weiteren könnte uPA auch direkt die Zellmigration und die Adhäsion beeinflussen, indem es mit seinem zellulären Rezeptor (uPAR) interagiert und somit die Bindung der Zellen an Vitronektin stimuliert oder aber auch ihre Interaktion mit den Integrinrezeptoren moduliert (Chapman et al., 1997; Czekay et al., 2003; Binder et al., 2007).

Im Widerspruch zu unseren Daten ergaben Studien mit uPA-überexprimierenden Tieren keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Plaques in Bezug auf Gehalt an Fibrinogen und Fibrin, die Zelldichte, den Kollagengehalt und den α -Aktin-Gehalt (Falkenberg et al., 2002; Cozen et al., 2004). Grund hierfür könnte sein, dass uPA bereits in physiologischen Konzentrationen in der Lage ist, das vorhandene Plasminogen vollständig zu aktivieren.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in uPA-überexprimierenden Kaninchen nach Endothelverletzung erhoben. In der entsprechenden Studie resultierte die Überexpression von uPA zwar in verstärktem Intimawachstum und dickeren Arterienwänden, es zeigte sich aber kein Unterschied in der Zusammensetzung der Neointima in Bezug auf Fibrinogen- und Fibringehalt, Zelldichte, Makrophagenanteil und Zellproliferation (Falkenberg et al., 2002).

Zellularität und Kollagengehalt sind ein Marker für die Rupturgefährdung arteriosklerotischer Plaques. In unseren Untersuchungen berücksichtigten wir weitere histologisch etablierte Marker und konnten in den neointimalen, vor allem aber

auch den spontan arteriosklerotischen Läsionen von DKO-Mäusen histologische Zeichen von Plaqueinstabilität zeigen. Dieser Effekt war besonders deutlich an einer Prädilektionsstelle für vulnerable Plaques im apoE-KO-Tiermodell (Williams et al., 2002), der *A. brachiocephalica*. In der Studie von Williams et al. starben über 65 % der apoE-KO-Mäuse innerhalb von 29 Wochen unter einer fettreichen Diät an einem plötzlichen Herzstillstand und zeigten thrombotisches Material im Lumen der Coronararterien, welches durch die Perfusion nicht entfernt wurde. Mehr als die Hälfte aller Tiere zeigten akute Rupturen der arteriosklerotischen Brachiozephalaques. Dabei waren die fibrösen Kappen dünner und die instabilen Plaques größer. Ein weiteres Merkmal der akuten Plaqueruptur war die Einblutung in die Läsionen (Williams et al., 2002). Verdeckte fibröse Kappen entstehen nach Abheilen von Rupturen und deren Blutungen und ihr Merkmal ist eine gesteigerte Zellularität der Plaques (Johnson et al., 2005). Unbemerkte Rupturen verursachen dadurch einen prozentualen Anstieg der Stenose und charakterisieren das Fortschreiten der Arteriosklerose (Burke et al., 2001).

Die Ruptur von arteriosklerotischen Plaques ist der häufigste Grund des plötzlichen Herzstillstands und trägt zu 60 % zum plötzlichen Tod durch Thrombose bei. Die Ruptur ereignet sich in Plaques mit dünnen fibrösen Kappen, einem entscheidenden Merkmal für Instabilität, und kann schließlich in Thrombose resultieren (Davis et al., 1985, Davis, 1992; Falk et al., 1995).

In den uPA-defizienten Mäusen dieser Arbeit war das Kappen-zu-Intima-Verhältnis reduziert, Einblutungen in die Neointima traten verstärkt auf und Rupturen der elastischen Laminae wurden vermehrt bei diesen Tieren ermittelt. Dreimal mehr verdeckte fibröse Kappen deuteten auf verheilte Rupturen hin.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest an den untersuchten Orten die stabilisierenden Effekte von uPA gegenüber einem direkten Abbau der Kappen und der damit verbundenen Destabilisierung der Plaques überwiegen. Grund hierfür ist vermutlich die uPA-abhängige Zellmigration und die Kollagenproduktion durch die glatten Muskelzellen. Physiologische Konzentrationen von uPA

scheinen in dem von uns gewählten Modell durch den Erhalt einer gewissen Zelldichte in den Plaques deren Stabilität zu sichern.

Gegensätzlich beschreiben Carmeliet et al. in einer Studie, dass an der Ruptur von Läsionen, wie zum Beispiel Aneurysmata der Aorta, wahrscheinlich Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und auch uPA beteiligt sind. MMPs werden als inaktive Zymogene (pro-MMPs) sezerniert und müssen im extrazellulären Kompartiment aktiviert werden. Plasmin, welches ebenfalls aus dem Zymogen Plasminogen durch uPA generiert wird, konnte *in vitro* als Aktivator der MMPs nachgewiesen werden. Die Analyse von apoE-uPA-DKO-Mäusen deutete darauf hin, dass die uPA-Defizienz vor Mediazerstörung und Aneurysmabildung schützt. Als möglicher Mechanismus wurde von den Autoren eine reduzierte Plasmin-abhängige Aktivierung der pro-MMPs vorgeschlagen. Plasmin könnte demnach ein pathophysiologisch signifikanter Aktivator der pro-MMPs sein und ein Ziel für innovative therapeutische Strategien zur Prävention der Gefäßschädigung der Aorta darstellen, indem die uPA-Genfunktion kontrolliert wird (Carmeliet et al., 1997b).

Cozen et al. beschrieben, dass nach etwa 11 Wochen die transgenen Tiere, welche apoE-defizient waren und uPA überexprimierten, spontan starben. Die histologischen Untersuchungen ergaben deutliche Hinweise für Herzinfarkt, signifikante Stenosen und vollständige Gefäßverschlüsse der proximalen koronaren Arterien. Die Arterienlumen waren dabei mit Schaumzellen verschlossen. Es konnten jedoch weder Blutungen innerhalb der Plaque, noch intraluminale Thromben oder Rupturen der Aorta festgestellt werden. Die Autoren gehen davon aus, dass Herzrhythmusstörungen zu frühzeitigem Tod geführt haben (Cozen et al., 2004). Diese Studie deutet darauf hin, dass uPA zur Integrität von arteriosklerotischen Plaques beiträgt.

Bezüglich der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse, sowohl was die quantitativen als auch die qualitativen Effekt von uPA auf Arteriosklerose im Tiermodell angeht, bleibt zu vermuten, dass dies der Heterogenität der Tiermodelle sowie

die Heterogenität der Induktion von Läsionen und untersuchten Prädilektionsstellen für Arteriosklerose zuzuschreiben ist.

Bezüglich der Modelle, die die Überexpression von uPA verwenden, ist es denkbar, dass eine bestimmte zelluläre Konzentration von uPA zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Läsionen führt, oberhalb derer kein Effekt zu erkennen ist. Ähnlich unphysiologisch ist eine Untersuchung mit dem vollständigen Fehlen des uPA-Gens.

Ebenfalls ist es denkbar, dass der Einfluss von uPA auf die Zusammensetzung von Plaques der proximalen Aorta geringer ist als auf Plaques anderer Lokalisationen, auch in unserem Modell zeigten sich bezüglich der Plaques der Aortenwurzel ja kaum Unterschiede. Grundsätzlich wirft sowohl die Verwendung uPA-transgener Tiere als die Verwendung von Knockout-Tiermodellen die Frage auf, ob die Ergebnisse nach starker Überexpression bzw. dem vollständigen Fehlen von uPA auf die physiologischen Bedingungen, z.B. in humanen arteriosklerotischen Läsionen, übertragbar sind.

Möglicherweise würden innovative Tiermodelle mit uPA-Knockdown, in denen eine Restkonzentration an uPA vorhanden ist, zur weiteren Identifizierung der molekularen Mechanismen beitragen.

5. Zusammenfassung

Arteriosklerose ist die Ursache für nahezu die Hälfte aller Todesfälle in den westlichen Industrienationen einschließlich Deutschland. Die jüngste veröffentlichte systematische Auswertung der Todesfallzahlen bezieht sich auf das Jahr 2011, in welchem in Deutschland von insgesamt 852.328 Todesfällen 37 % auf Herz- und Kreislauferkrankungen zurückzuführen sind (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2011). Myokardinfarkte stellen mit 6 % aller Todesfälle die zweithäufigste (nach der chronischen koronaren Herzkrankheit) Einzelursache innerhalb dieser Gruppe dar. Epidemiologisch sind also die Plaquebildung im Rahmen der Arteriosklerose sowie komplizierend nach Ruptur vulnerabler Läsionen entstehende Thrombosen von großer Bedeutung.

Arteriosklerotische Läsionen des Menschen weisen eine erhöhte Expression von uPA in der Gefäßwand auf (Lupu et al., 1995; Padro et al., 1995; Kienast et al., 1998). Die Rolle von uPA in der Pathogenese der Arteriosklerose ist und war daher Gegenstand klinischer und experimenteller Untersuchungen. Zur Klärung der zugrundeliegenden Mechanismen wurden Zellkulturversuche sowie Tiermodelle entwickelt, die der menschlichen Arteriosklerose möglichst weitgehend ähneln.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand des apoE-Knockout-Mausmodells sowie des Eisenschloridmodells mittels einer chemischen Endothelschädigung der Einfluss von uPA auf Thrombose, Fibrinolyse, vaskuläres Remodelling und die Entwicklung arteriosklerotischer Plaques untersucht.

Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Einfluss von uPA auf die Thrombose von Gefäßen nach Endothelschaden. Auch die Rekanalisation der thrombosierten Gefäße als Parameter für die intravaskuläre Fibrinolyse war nach 20 Minuten sowie nach 3 Wochen statistisch unverändert. Es zeigte sich aber ein Effekt auf das vaskuläre Remodelling und die Organisation intraluminaler Thromben nach Endothelschädigung.

Neointimale Läsionen entwickeln sich in Abwesenheit von uPA in den apoE-KO-Mäusen stärker als in der apoE-KO-Kontrollgruppe, es resultierte einer stärkere Stenosierung des Gefäßlumens. Die Mediafläche sowie die Gesamtfläche der Gefäße in DKO-Mäusen waren hingegen kleiner als in den apoE-KO-Kontrollen.

Spontane arteriosklerotische Läsionen wurden bei 12 Monate alten Mäusen in verschiedenen Lokalisationen (Koronararterien, proximale Aorta, *A. brachiocephalica*) untersucht. Eine größere Lumenstenose zeigte sich dabei in zwei Lokalisationen (Koronararterien und *A. brachiocephalica*), in der proximalen Aorta unterschied war die Größe der arteriosklerotischen Plaques nicht unterschiedlich zwischen Doppelknockoutmäusen und Kontrollgruppe. Eine Verringerung der Mediafläche war für die Koronararterien ebenfalls zu beobachten (in den anderen Lokalisationen nicht untersucht), eine Verringerung der Gefäßgesamtfläche war nicht signifikant nachweisbar.

Die Zusammensetzung von experimentell erzeugter Neointima und arteriosklerotischen Plaques wurden in Hinblick auf Zellularität, Gehalt an SMCs, Fibrinogengehalt und Kollagengehalt untersucht. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass das Fehlen von uPA zu deutlich zellärmeren Läsionen führt. Dieser Effekt war für die experimentell erzeugten Läsionen, Koronararterien und *A. brachiocephalica* signifikant nachweisbar. Insbesondere der Anteil glatter Muskelzellen war in den DKO-Mäusen vermindert. Dies war signifikant nachweisbar in den experimentell erzeugten Läsionen, den Koronararterien und der *A. brachiocephalica*, in letzterer Lokalisation war auch der Gehalt an Kollagen stark vermindert. Der Kollagengehalt korrelierte hier signifikant mit dem Gehalt an SMCs. Hingegen lag Fibrinogen in allen untersuchten Lokalisationen in den Plaques signifikant vermehrt vor.

Die Untersuchung verschiedener histologischer Parameter für Plaqueinstabilität wie das Verhältnis der Kappe zur Neointimagesamtgröße, Einblutungen in die Plaques und Rupturen der elastischen *Laminae* der Media und *buried fibrous caps* zeigte sowohl für die experimentell erzeugten Gefäßläsionen als auch für die *A. brachiocephalica* das vermehrte Vorkommen von Zeichen der Plaqueinstabilität in DKO-Mäusen.

In der vorliegenden Arbeit zeigen also apoE-KO-Mäuse bei zusätzlichem Fehlen des uPA-Gens eine stärkere Plaquebildung sowie vermehrte Zeichen für Plaqueinstabilität. Die könnte durch die Bedeutung von uPA nicht nur für die Fibrinolyse, sondern ebenso für die (perizelluläre) Proteolyse und die Migration glatter Gefäßmuskelzellen begründet sein.

6. Anhang:

Aus dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen:

Veröffentlichungen als Originalarbeit in einer wissenschaftlichen Zeitschrift mit Peer review Verfahren:

1. Dellas C, **Schremmer C**, Hasenfuss G, Konstantinides SV, Schäfer K (2007): Lack of urokinase plasminogen activator promotes progression and instability of atherosclerotic lesions on apolipoprotein E-knockout mice. *Thromb Haemost* 98, 220 - 227

Veröffentlichungen als Poster und Abstracts:

1. Schäfer K, **Schremmer C**, Dellas C, Konstantinides S. Lack of urokinase plasminogen activator promotes instability of vascular lesions in apolipoprotein E-knockout mice.
Posterpräsentation auf dem Jahreskongress der Gesellschaft American Heart "Scientific Sessions 2004", New Orleans
Als Abstract in: *Circulation (Suppl)* 2004; 110, III-124 - III-125
2. **Schremmer C**, Schäfer K, Dellas C, Konstantinides S. Urokinase-Plasminogen-Aktivator fördert die Stabilität vaskulärer Läsionen in Apolipoprotein E-Knockout Mäusen.
Posterpräsentation auf der 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2005
Als Abstract veröffentlicht in: *Z Kardiol* 2005; 94 (Suppl 1), P675

7. Literaturverzeichnis

Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton Sk, Binckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P (1998): Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 97, 2433 – 2444.

Allan CM, Walker D, Taylor JM (1995): Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 270, 26278 - 26281.

Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS (2006) Inflammatory Biomarkers in Acute Coronary Syndromes Part I: Introduction and Cytokines. *Circulation* 113, e72 - e75

Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlborn A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J (2007) Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA* 98, 1300 - 1311.

Bennett MR (2001): Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signaling. *Circ Res* 88, 895 – 902.

Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P (1998): Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*. 282, 290 – 293.

Bentzon JF, Sondergaard CS, Kassem M, Falk E (2007): Smooth Muscle Cells Healing Atherosclerotic Plaque Disruptions Are of Local, Not Blood, Origin in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Circulation* 116, 2053 - 2061.

Binder BR, Mihaly J, Prager GW (2007): uPAR – uPA – PAI-1 interactions and signaling: A vascular biologist's view. *Thromb Haemost* 97, 336 – 342.

Bond AR, Jackson CL (2011): The Fat-Fed Apolipoprotein E Knockout Mouse Brachiocephalic Artery in the Study of Atherosclerotic Plaque Rupture. *J Biomed Biotechnol* 2011, 379069.

Bot I, von der Thüsen JH, Donners MM, Lucas A, Fekkes ML, de Jager SC, Kuiper J, Daemen MJ, van Berkel TJ, Heeneman S, Biessen EA (2003): Serine protease inhibitor Serp-1 strongly impairs atherosclerotic lesion formation and induces a stable plaque phenotype in ApoE-KO mice. *Circ Res* 93, 464 - 471.

Boyle JJ, Bowyer DE, Weissberg PL, Bennett MR (2001): Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1402–1407

Breslow JL (1996): Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272, 685 - 688.

Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL (1980): The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 13, 67 - 81.

Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJ, Degen JL (1996): Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* 87, 709 - 719.

Burke AP, Kolodgie FD, Farb A (2001): Healed plaque ruptures and sudden coronary death : evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 103, 934 – 940.

Calara F, Silvestre M, Casanada F, Yuan N, Napoli C, Palinski W (2001): Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol* 195, 257 – 263.

Callow MJ, Verstuyft J, Tangirala R, Palinski W, Rubin EM (1995): Atherogenesis in transgenic mice with human apolipoprotein B and lipoprotein (a). *J Clin Invest* 96, 1639 - 1646.

Carmeliet P, Collen D (1996): Gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation system in mice. *Semin Thromb Hemost* 22, 525 - 542.

Carmeliet P, Collen D (1998): Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 91, 255 - 285.

Carmeliet P, Moons L, Herbert JM, Crawley J, Lupu F, Lijnen R, Collen D (1997a): Urokinase but not tissue plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice. *Circ Res* 81, 829 - 839

Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D (1997b): Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 17, 439 - 444

Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D, Gerard RD (1997c): Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circ* 96, 3180 - 91

Carmeliet P, Moons L, Ploplis V (1997d): Impaired arterial neointima formation in mice with disruption of the plasminogen gene. *J Clin Invest* 99: 200 - 208.

Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M (1998): Receptor-independent role of urokinase-type plasminogen activator in pericellular plasmin and matrix metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice. *J Cell Biol* 140, 233 - 245

Chapman HA (1997): Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 9, 714-724

Chomiki N, Henry M, Alessi MC, Anfosso F, Juhan-Vague I (1994): Plasminogen activator inhibitor-1 expression in human liver and healthy or atherosclerotic vessel walls. *Thromb Haemost* 72, 44 - 53.

Clarke MC, Figg N, Maguire JJ (2006): Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 12, 1075 - 1080.

Clowes AW, Clowes MM, Au YP, Reidy MA, Belin D (1990): Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. *Circ Res* 67, 61 - 67.

Collen D (2001): Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Am Soc Hematol Educ Program* 2001, 1 - 9.

Conese M, Nykjaer A, Petersen CM, Cremona O, Pardi R, Andreasen PA, Gliemann J, Christensen EI, Blasi F (1995): α -2 Macroglobulin receptor/Ldl receptor-related protein(Lrp)-dependent internalization of the urokinase receptor. *J Cell Biol* 131, 1609 - 1622.

Cozen AE, Moriwaki H, Kremen M, DeYoung MB, Dichek HL, Slezicki KI, Young SG, Véniant M, Dichek DA (2004): Macrophage-targeted overexpression of urokinase causes accelerated atherosclerosis, coronary artery occlusions, and premature death. *Circulation* 109, 2129 - 2135.

Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Heymans S, Moons L, Collen D, Daemen M, Carmeliet P (2000): Disruption of the plasminogen gene in mice abolishes wound healing after myocardial infarction. *Am J Pathol* 156, 1865 - 1873.

Cullen P, Baetta R, Bellosta S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, von Eckardstein A, Exley A, Goddard M, Hofker M, et al. (2003) Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 535 - 542

Cullen P, Nicholl SM, Sayeed S, Sitzmann JV, Okada SS, Cahill PA, Redmond EM (2004): Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency enhances flow-induced smooth muscle cell migration. *Thromb Res* 114, 57 - 65

Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA (2003): Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 160, 781 – 791

Damani SB, Topol EJ (2011): Emerging genomic applications in coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Interv* 4, 473 - 482

Darras V, Thienpont M, Stump DC, Collen D (1986): Measurement of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on three murine monoclonal antibodies. *Thromb Haemost* 56, 411 - 414

Davignon J, Gregg RE, Sing CF (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 8, 1 - 21

Davies MJ (1992): Anatomic features in victims of sudden coronary death: coronary artery pathology. *Circulation* 85(suppl 1), I-19 - I-24.

Davies MJ, Thomas AC (1985): Plaque fissuring: the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 53, 363 – 373

De Caterina A, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK (1995): Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96, 60 - 68

De Knijff P, Havekes LM (1996): Apolipoprotein E as a risk factor for coronary heart disease: a genetic and molecular biology approach. *Curr Opin Lipidol* 7, 59 – 63

Deng G, Curriden SA, Wang S (1996): Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol* 134, 1563 – 1571

Deng G, Martin-McNulty B, Sukovich DA, Freay A, Halks-Miller M, Thinnest T, Loskutoff DJ, Carmeliet P, Dole WP, Wang YX (2003): Urokinase-type plasminogen activator plays a critical role in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm. *Circ Res* 92, 510 - 517

De Nigris F, Lerman LO, Ignarro SW, Sica G, Lerman A, Palinski W, Ignarro LJ, Napoli C (2003): Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1420 - 1425

Desurmont C, Caillaud JM, Emmanuel F, Benoit P, Fruchart JC, Castro G, Bran-ellec D, Heard JM, Duverger N (2000): Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoE-deficient/nude mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 435 - 442

Doggen JM, Smith NL, Lemaitre RN, Heckbert SR, Rosendaal FR, Psaty BM (2004): Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1970 - 1975

Ellis V, Danø K (1991): Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. *Semin Thromb Hemost* 17, 194 - 200

Eriksson E (2004): Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects. *Curr Opin Lipidol* 15, 553-558

Falk E, Shah P, Fuster V (1995): Coronary plaque disruption. *Circulation* 92, 657 - 671

Falkenberg M, Björnheden T, Lindner P (1998): Co-localization of fibrinolytic activators and inhibitors with macrophages in atherosclerotic vessels. *Cardiovasc Pathol* 7, 223 - 231

Falkenberg M, Tom C, DeYoung MB, Wen S, Linnemann R, Dichek DA (2002): Increased Expression of urokinase during atherosclerotic lesion development causes arterial constriction and lumen loss, and accelerates lesion growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10665 - 10670

Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P (1998): Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation* 97, 1002

Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y, Harpel J, Hedin CH, Rifkin D (1993): Role of the latent TGF- β binding protein in the activation of latent TGF- β by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 120, 995 - 1002

Fogelman AM, Van Lenten BJ, Warden C, Haberland ME, Edwards PA (1988): Macrophage lipoprotein receptors. *J Cell Sci Suppl* 9, 135 - 149

Folkesson M, Silveira A, Eriksson P, Swedenborg J (2011): Protease activity in the multi-layered intra-luminal thrombus of abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 218, 294 – 299

Fuhrman B (2012): The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 222, 8-14

Gebbink MF, Bouma B, Maas C, Bouma BN (2009): Physiological responses to protein aggregates: fibrinolysis, coagulation and inflammation (new roles for old factors). *FEBS Lett* 583, 2691 - 2699

Georgiadou D, Chroni A, Vezeridis A, Zannis VI, Stratikos E (2011): Biophysical analysis of apolipoprotein E3 variants linked with development of type III hyperlipoproteinemia. *PLoS One* 6:e27037

Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2011): http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=1&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DAT-CUE=_XWD_30&D.001=1000001&D.002=1000002&D.003=1000004&D.022=9994&D.007=9211; zuletzt aufgerufen am 06.03.2013

Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Breser HB Jr (1981): Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 214, 1239 - 1241

Gimbrone MA Jr. (1999): Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 82, 722 - 726

Glass CK, Witztum JL (2001): Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104, 503 - 516.

Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS (2000): Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 102, 2861 - 2866

Grau E, Moroz LA (1989) Fibrinolytic activity of normal human blood monocytes. *Thromb Res* 53, 145 - 162

Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM (1998): Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 137, 1 - 11

Huang Y, Song L, Wu S, Fan F, Lopes-Virella MF (2001): Oxidized LDL differentially regulates MMP-1 and TIMP-1 expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 156, 119 - 125

Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK (1994): Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93, 1885 - 1893

Jackson CL (2007): Is there a Life after Plaque Rupture? *Biochem Soc Trans* 35, 887 - 889

Jackson CL, Bennett MR, Biessen EA, Johnson JL, Krams R (2007): Assessment of unstable atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 714 - 720

Johnson J, Carson K, Williams H (2005): Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment. *Circulation* 111, 1422 – 1430

Kienast J, Padró T, Steins M, Li CX, Schmid KW, Hammel D, Scheld HH, van de Loo JC (1998): Relation of urokinase-type plasminogen activator expression to presence and severity of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Thromb Haemost* 79, 579 - 586

Konstantinides S, Schäfer K, Thinner T (2001): Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation* 103, 576 – 583

Korshunov VA, Berk BC (2003): Flow-induced vascular remodeling in the mouse: a model for carotid intima-media thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2185 - 2191

Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T (1995): Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 92, 1084 – 1088

Kremen M, Krishnan R, Emery I, Ju JH, Slezicki KI, Wu A, Qian K, Du L, Plawman A, Stempien-Otero A, Dichek DA (2008): Plasminogen mediates the atherogenic effects of macrophage-expressed urokinase and accelerates atherosclerosis in apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17109 - 17114

Krishnan R, Kremen M, Hu JH, Emery I, Farris SD, Slezicki KI, Chu T, Du L, Dichek HL, Dichek DA (2009): Level of macrophage uPA expression is an important determinant of atherosclerotic lesion growth in Apoe^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Nov;29(11):1737-44

Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S (1985): Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Atherosclerosis* 5, 293 - 302

- Kumar A, Lindner V (1997):** Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Basc Biol* 17, 2238 - 2244
- Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT. (1999):** Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation* 99, 361 – 369
- Larsson LI, Skriver L, Nielsen LS, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Danø K (1984):** Distribution of urokinase-type plasminogen activator immunoreactivity in the mouse. *J Cell Biol* 98, 894 - 903
- Leskinen M, Wang Y, Leszczynski D, Lindstedt KA, Kovanen PT (2001):** Mast cell chymase induces apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 516 – 522
- Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L (1988):** The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 29, 245 - 271
- Libby P (1999):** Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247, 349 - 358
- Libby P (2001):** Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104, 365 – 372
- Lijnen HR (2002):** Matrix Metalloproteinases and Cellular Fibrinolytic Activity. *Biochemistry (Moscow)* 67, 92 - 98
- Lijnen HR, Collen D (1999):** Matrix metalloproteinase system deficiencies and matrix degradation. *Thromb Haemost* 82, 837 - 845
- Lijnen HR, Stump DC, Collen DC (1987):** Single-chain urokinase-type plasminogen activator: mechanism of action and thrombolytic properties. *Semin Thromb Hemost* 13, 152 - 159
- Lijnen HR, Van Hoef B, Lupu F (1998):** Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1035 – 1045
- Lluís F, Roma J, Suelves M, Parra M, Aniorte G, Gallardo E, Rodríguez L, Hughes SM, Carmeliet P, Roig M, Muñoz-Cánoves (2001):** Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood* 97, 1703 - 1711

Loskutoff DJ, Quigley JP (2000): PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix. *J Clin Invest* 106, 1441 - 1443

Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, Cousin E, Genton CY, Bachmann F, Kruithof EK (1993): Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb* 13, 1090 - 1100

Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruithof EK (1995): Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1444 - 1455

Lusis AJ (2000): Atherosclerosis. *Nature* 407, 233 - 241

Mann JM, Davies MJ (1996): Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 94, 928 - 931

Meltzer EM, Doggen JM, de Groot PG, Rosendaal FR, Lisman T (2009): Plasma levels of fibrinolytic proteins and the risk of myocardial infarction in men. *Blood* 116, 529 - 536

Nagamine Y, Sudol M, Reich E (1983): Hormonal regulation of plasminogen activator mRNA production in porcine kidney cells. *Cell* 32, 1181 - 1190

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994): ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133 - 140

NCBI Gene Database (2012): www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11816 und www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/348 (aufgerufen am 06.03.2013)

Padró T, Emeis JJ, Steins M, Schmid KW, Kienast J (1995): Quantification of plasminogen activators and their inhibitors in the aortic vessel wall in relation to the presence and severity of atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 893 - 902

Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P (1985): Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57, 65 - 73

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA (1987): Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68, 231-240

Palinski W, Tangirala RK, Miller E, Young SG, Witztum JL (1995): Increased autoanti-body titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient

mice with increased atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1569 - 1576

Patel VA, Zhang QJ, Siddle K, Soos MA, Goddard M, Weissberg PL (2001): Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signalling. *Circ Res* 88, 895 - 902

Pearson D, Altus MS, Horiuchi A, Nagamine Y (1987): Dexamethasone coordinately inhibits plasminogen activator gene expression and enzyme activity in porcine kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun* 143, 329 - 336

Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, Orci L (1987): Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105, 2535 - 2541

Phipps RP (2000): Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6930 - 6932

Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver PM, Maeda N (1992): Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4471 - 4475

Piguet PF, Vesin C, Donati Y, Tacchini-Cottier F, Belin D, Barazzone C (1999): Urokinase receptor (uPAR, CD87) is a platelet receptor important for kinetics and TNF-induced endothelial adhesion in mice. *Circulation* 99, 3315 - 3321

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992): Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343 - 353

Preissner KT, Kanse SM, Chavakis T, May AE (1999): The dual role of the urokinase receptor system in pericellular proteolysis and cell adhesion: implications for cardiovascular function. *Basic Res Cardiol* 94, 315 - 321

Purcell-Huynh DA, Farese RV Jr, Johnson DF, Flynn LM, Pierotti V, Newland DL, Linton MF, Sanan DA, Young SG (1995): Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J Clin Invest* 95, 2246 - 2257

Pynn M, Schäfer K, Konstantinides S, Halle M (2004): Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109, 386 - 392

Reddick RL, Zhang SH, Maeda N (1998): Aortic atherosclerotic plaque injury in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 140, 297 - 305

Reidy MA, Irvin C, Lindner V (1996): Migration of arterial wall cells. Expression of plas-minogen activators and inhibitors in injured rat arteries. *Circ Res* 78, 405 - 414

Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Work CW, Kim JS, Gordon D, Keiser JA, Ryan MJ (1998): Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res* 83, 705 - 713

Rensen PC, van Berkel TJ (1996): Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 271, 14791 - 14799

Rocnik EF, Chan BMC, Pickering JG (1998): Evidence for a Role of Collagen Synthesis in Arterial Smooth Muscle Cell Migration. *J Clin. Invest* 101, 1889 - 1898

Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM (2000): Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2587 - 2592

Ross R (1986): The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N Engl J Med* 314, 488 - 500

Ross R (1991): Polypeptide growth factors and atherosclerosis. *Trends Cardio-vasc Med* 1, 277 - 282

Ross R (1999): Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115 - 126

Schäfer K, Konstantinides S, Riedel C, Thinner T, Müller K, Dellas C, Hasenfuss G, Loskutoff DJ (2002): Different mechanisms of increased luminal stenosis after arterial injury in mice deficient for urokinase- or tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 106, 1847 - 1852

Schäfer K, Müller K, Hecke A, Mounier E, Goebel J, Loskutoff DJ, Konstantinides S (2003): Enhanced thrombosis in atherosclerosis-prone mice is associated with increased arterial expression of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2097 - 2103

Schneiderman J, Bordin GM, Engelberg I (1995): Expression of fibrinolytic genes in atherosclerotic abdominal aortic aneurysm wall. A possible mechanism for aneurysm expansion. *J Clin Invest* 96, 639 - 645

Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ (1992): Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6998 - 7002

Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P (2000): CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 156, 7 - 14

Singh I, Burnand KG, Collins M, Luttun A, Collen D, Boelhouwer B, Smith A. (2003): Failure of Thrombus to Resolve in Urokinase-Type Plasminogen-Activator Gene-Knockout Mice: Rescue by normal Bone Marrow-Derived Cells. *Circulation* 107, 869 - 875

Song Y, Stampfer MJ, Liu S (2004): Meta-Analysis: Apolipoprotein E Genotypes and Risk for Coronary Heart Disease. *Ann Intern Med* 141, 137 - 147

Sperti G, van Leeuwen RTJ, Quax PHA, Maseri A, Klufft C (1992): Cultured rat aortic vascular smooth muscle cells digest naturally produced extracellular matrix. *Circ Res* 71, 385 - 392

Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995): A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92, 1355 - 1374

Stefansson S, Lawrence DA (1996): The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin α V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383, 441 - 443

Stump DC, Thienpont M, Collen D (1986): Urokinase-related proteins in human urine. Isolation and characterization of single-chain urokinase (pro-urokinase) and urokinase-inhibitor complex. *J Biol Chem* 261, 1267 - 1273

Strauss BH, Lau HK, Bowman KA, Sparkes J, Chisholm RJ, Garvey MB, Fenkell LL, Natarajan MK, Singh I, Teitel JM (1999): Plasma urokinase antigen and plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels predict angiographic coronary restenosis. *Circulation* 100, 1616 - 1622

Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P (1999): Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 99, 2503 - 2509

Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W (1995): Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire

aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 36, 2320 – 2328

Tripputi P, Blasi F, Verde P, Cannizzaro LA, Emanuel BS, Croce CM (1985): Human urokinase gene is located on the long arm of chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4448 - 4452

Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, Tedgui A (1996): Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1256 – 1262

Van den Maagdenberg AM, de Knijff P, Stalenhoef AF, Gevers Leuven JA, Ha-vekes LM, Frants RR (1989): Apolipoprotein E*3-Leiden allele results from a partial gene duplication in exon 4. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 851 - 857

van der Kaaden ME, Rijken DC, Groeneveld E, van Berkel TJ, Kuiper J (1995): Native and non-glycosylated recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator are recognized by different receptor systems on rat parenchymal liver cells. *Thromb Haemost* 74, 722 - 729

Van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM, Hofker MH (1994): Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 111, 25 - 37

Van Vlijmen BJ, van den Maagdenberg AM, Gijbels MJ, van der Boom H, HogenEsch H, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM (1994): Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Clin Invest* 93, 1403 - 1410

Vassalli JD, Baccino D, Belin D (1985): A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol* 100, 86 - 92

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP (2000): Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1262 – 1275

Von der Thüsen JH, van Berkel TJ, Biessen EA (2001): Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 103, 1164 – 1170

Wang Y, Shiota N, Leskinen MJ, Lindstedt KA, Kovanen PT (2001): Mast cell chymase inhibits smooth muscle cell growth and collagen expression in vitro: transforming growth factor-beta1-dependent and -independent effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1928 – 1933

Wardell MR, Weisgraber KH, Havekes LM, Rall SC Jr (1989): Apolipoprotein E3-Leiden contains a seven-amino acid insertion that is a tandem repeat of residues 121-127. *J Biol Chem* 264, 21205 - 21210

Williams H, Johnson JL, Carson KG (2002): Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 788 – 792

Xiao Q, Danton MJ, Witte DP, Kowala MC, Valentine MT, Bugge TH, Degen JL (1997): Plasminogen deficiency accelerates vessel wall disease in mice predisposed to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10335 - 10340

Xu (2004): Mouse Models of Arteriosclerosis: From Arterial Injuries to Vascular Grafts. *Am J Pathol* 165, 1-10

Xue P, Niu WQ, Jiang ZY, Zheng MH, Fei J (2012): A Meta-Analysis of Apolipoprotein E Gene $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ Polymorphism for Gallbladder Stone Disease. *PLoS One* 7, e45849

Yildiz SH, Ozdemir EM, Artan S, Solak M, Yaman M, Ozbabalik BD, Arikan Terzi ES (2012): Association of alzheimer's disease with apoE and IL-1 α gene polymorphisms. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2012 Oct 4 (Vorabveröffentlichung als Online-Publikation).

Yin Y-W, Zhang Y-D, Wang J-Z, Li B-H, Yang Q-W, Fang CH-Q, Gao Ch-Y, Li J-Ch, Zhang L-L (2012): Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of multiple sclerosis: A meta-analysis of 6977 subjects. *Gene* 511, 12-17

Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J (2011): Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011, 497841

Ziegler A, Hagmann J, Kiefer B, Nagamine Y (1990): Ca²⁺ potentiates cAMP-dependent expression of urokinase-type plasminogen activator gene through a calmodulin- and protein kinase C-independent mechanism. *J Biol Chem* 265, 21194 - 21201

Zhu Y, Farrehi PM, Fay WP (2001): Plasminogen activator inhibitor type 1 enhances neointima formation after oxidative vascular injury in atherosclerosis-prone mice. *Circulation* 103, 3105 - 3110

Danksagung

Für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich bei Dr. C. Dellas, Prof. Dr. K. Schäfer und Prof. Dr. S. Konstantinides herzlichst bedanken.