

LMU München

Funktionelle Bedeutung des thrombozytären Kalzium abhängigen Kaliumkanals KCa3.1

Medizinische Fakultät

Nicole Hellwig
2012

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

Funktionelle Bedeutung des thrombozytären Kalzium abhängigen Kaliumkanals KCa3.1

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Nicole Hellwig

aus

Frankfurt am Main

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. Florian Krötz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Spannagl

Prof. Dr. Laurenz J. Wurzinger

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2012

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Thrombozyten und deren Funktionen.....	1
1.2	Aktivierung von Thrombozyten	2
1.3	Rolle der Thrombozyten in verschiedenen Krankheitsbildern	5
1.4	Endogene Hemmung von Thrombozyten in gesunden Blutgefäßen	8
1.5	Rolle des EDHF für die Thrombozytenfunktion	10
1.6	Kaliumkanäle und deren Expression auf Thrombozyten.....	12
2	Fragestellung.....	13
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Tiermodell.....	14
3.2	Narkose	15
3.3	Isolierung und Reinigung von Thrombozyten.....	16
3.3.1	Thrombozytenisolierung für Aggregationsuntersuchung in vitro.....	17
3.3.2	Thrombozytenisolierung und Färbung für in vivo Versuche	17
3.3.3	Isolierung von Thrombozyten zur Herstellung von Proteinlysat.....	18
3.4	Proteinchemische Methoden	19
3.4.1	Proteinisolation aus Thrombozyten	19
3.4.2	Proteinbestimmung (nach Biuret).....	19
3.4.3	SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese	20

3.4.4	Western - Blotting	22
3.4.5	Färbung von Proteinen	22
3.5	Immunologische Methoden	23
3.5.1	Immunoprint für KCa3.1	23
3.6	Hämatologische Untersuchungen	24
3.7	Durchflusszytometrie.....	25
3.7.1	Thrombozytäres Membranpotential.....	25
3.7.2	Rezeptorexposition auf Thrombozyten.....	26
3.8	Aggregometrie	28
3.9	Chirurgische Techniken.....	29
3.9.1	Rückenhautkammermodell	29
3.9.2	Arterielle und venöse Katheterisierung	32
3.10	Intravitalmikroskopie	33
3.10.1	Material, technischer Aufbau des Arbeitsplatzes	33
3.10.2	Digitale Datenaquisition	35
3.10.3	Datenverarbeitung	35
3.11	Intravitale Versuche	36
3.11.1	Thrombozyten-Endothel-Interaktion in vivo.....	36
3.11.2	Thrombusbildung nach Gefäßverletzung.....	37
3.12	Statistik.....	38

4	Ergebnisse	39
4.1	Proteinanalyse von Thrombozyten auf KCa3.1	39
4.2	Blutbild von Wildtyp und KCa3.1 KO Mäusen	40
4.2.1	Kleines Blutbild	40
4.2.2	Thrombozyten-Größe	41
4.3	Rezeptorexposition auf ruhenden Thrombozyten	42
4.4	Membranpotentialmessung an Maus-Thrombozyten	44
4.5	Reversible und irreversible Thrombozytenaktivierung bei Wildtyp und KCa3.1 KO Thrombozyten	46
4.6	Thrombozyten-Endothel-Interaktion an KCa3.1 KO Mäusen	49
4.7	Rolle des KCa3.1 Kanals auf Thrombozyten beim thrombotischen Gefäßverschluss nach experimenteller Gefäßverletzung.....	51
5	Diskussion.....	54
5.1	Phänotyp KCa3.1-difizienter Mäuse	55
5.2	KCa3.1 KO Thrombozyten zeigen ein schnelleres Erreichen der Aktivierungsschwelle in vitro.....	56
5.3	Ausschaltung der KCa3.1 Kanäle führt zu erhöhter Thrombozyten-Aktivität in vivo	61
5.3.1	Potentielle Mechanismen einer verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion mit KO Thrombozyten	61
5.3.2	Erhöhtes Risiko zur Thrombusbildung in KCa3.1 KO Mäusen	62
5.4	Limitationen und Schlussfolgerung	64

6	Zusammenfassung	66
7	Abbildungsverzeichnis.....	68
8	Tabellenverzeichnis.....	69
9	Abkürzungen	70
10	Referenzen	76

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten und deren Funktionen

Humane Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind im inaktiven Zustand diskoid und mit einem Durchmesser von 1–4 μm und einer Dicke von 0,5–0,75 μm die kleinsten zellähnlichen Partikel im Blut. Im gesunden Menschen befinden sich 150.000–400.000 Thrombozyten / μl (Schmidt et al. 2000; Klinker et al. 2001) im Blut. Sie sind hauptsächlich für die primäre Hämostase („Blutstillung“) verantwortlich, wobei sie an eine verletzte Stelle im Blutgefäß anhaften („adhärieren“), dabei aktiviert werden, ihre Form verändern und über die Bildung von Fibrinogenbrücken mit weiteren Thrombozyten verklumpen („aggregieren“). Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und sind daher nur in sehr geringem Maße zur Neusynthese von Proteinen fähig, weshalb sie nicht als vollwertige Blutzellen bezeichnet werden können. Nach ihrer Entstehung durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark haben unverbrauchte Thrombozyten im Blut eine Lebensdauer von etwa 8 bis 12 Tagen, bevor sie vom retikuloendothelialen System in Leber und Milz abgebaut werden. Während ihrer Aktivierung schütten Thrombozyten zahlreiche Substanzen, darunter auch viele prothrombotisch wirkende Substanzen aus, z.B. ADP, Thromboxan A_2 , Serotonin und Calcium-Ionen (Gawaz 1999).

Neben Ihrer Hauptfunktion, der primären Hämostase, besteht ein Einfluss von Thrombozyten auf Immunantwort (Sowa et al. 2009) und Angiogenese (Varon et al. 2009),

worauf hier aber nicht weiter eingegangen werden soll. Die Beteiligung der Thrombozyten an Entzündungsreaktionen, wodurch sie auch an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sind, ist ein weiterer wichtiger Punkt und wird später gesondert angesprochen (siehe Abschnitt 1.3).

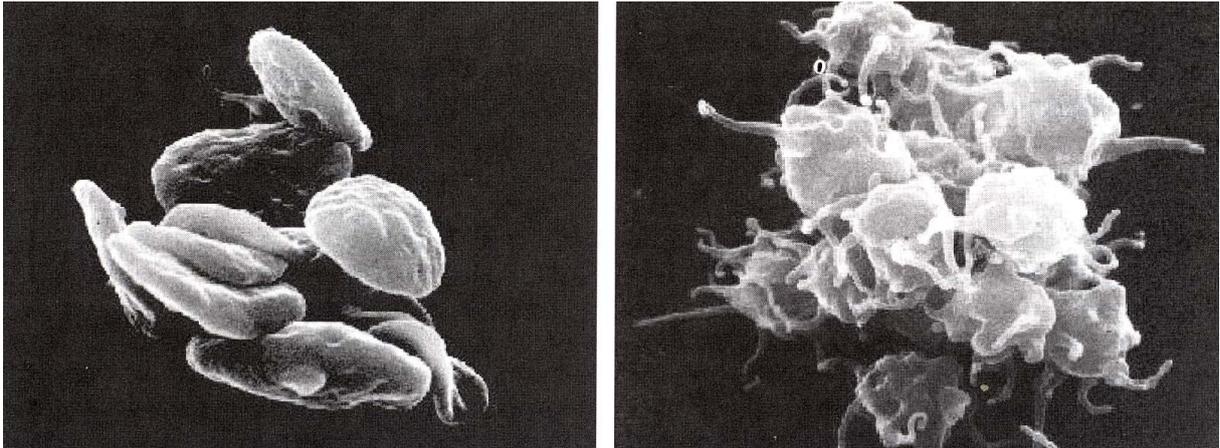


Abbildung 1.1: Ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten.

Die ruhenden Thrombozyten haben eine typische Linsenform. Nach Stimulierung bildet der aktivierte Thrombozyt lange schmale Podozyten. Aus (Gawaz 1999) mit Verweis auf [http://www.platelet page](http://www.plateletpage)

1.2 Aktivierung von Thrombozyten

Die Aktivierung der Thrombozyten kann über verschiedene Signalwege initiiert werden. Bei einer Gefäßverletzung adhäriert der Thrombozyt primär über seinen Glykoprotein (GP) Ib-V-IX Rezeptor an kollagenimmobilisierten von-Willebrand-Faktor (vWF) in der subendothelialen Matrix. Eine sekundäre Stabilisierung dieser ersten Bindung findet durch

Interaktion mit Fibronektin, Kollagen und Laminin an der subendothelialen Matrix statt. Dabei führt besonders die Bindung über den Glykoprotein VI (GP VI) mit Kollagen zur Aktivierung (Jandrot-Perrus et al. 2000; Nieswandt et al. 2001; Nieswandt et al. 2003) und Formveränderung, dem sogenannten „shape change“ (Siess 1989; Paul et al. 1999) des Thrombozyten. Der aktivierte Thrombozyt sezerniert verschiedene autokrin wirkende Substanzen, unter anderem Thromboxan A₂ und ADP. Thromboxan A₂ bindet an TP-Prostanoidrezeptoren (Armstrong 1996), während ADP hauptsächlich an purinerge ADP-spezifische P_{2Y}₁₂ und P_{2Y}₁ Rezeptoren bindet (Daniel et al. 1998; Cattaneo et al. 2000; Gachet 2001). Beide Substanzen verstärken die Aktivierung und Aggregation bzw tragen zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten bei (Siess 1989). Thromboxan A₂ löst außerdem im Gefäß eine vasokonstriktorische Reaktion aus. Das ebenfalls von Thrombozyten ausgeschüttete sowie aus dem Prothrombinkomplex gebildete Thrombin bindet sowohl an den GPIIb-V-IX Rezeptor-Komplex als auch an Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) und ist ebenfalls ein starker Thrombozyten-Aktivator (Coughlin 1993; Coughlin 2001). Die aktivierten Thrombozyten verbinden sich über ihre GPIIb-IIIa Rezeptoren und im Plasma gelöstes Fibrinogen, was zur Aggregation des Thrombozyten führt. Zunächst ist die Aggregation über Fibrinogenbrücken reversibel; dies wird auch primäre Aggregation genannt. Erst bei der sekundären Aggregation wird im Zusammenspiel mit der sekundären Hämostase, der Gerinnungskaskade, die Verbindung durch die Thrombin-abhängige Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin irreversibel und damit stabil. Hierbei und bei vielen weiteren Schritten der Aktivierung sind Calcium-Ionen (Ca²⁺) notwendig. Sie strömen sowohl durch Calcium-Kanäle in der Zellmembran, wie dem ATP-aktivierten P_{2X}₁ (Mahaut-Smith et al. 1990b; MacKenzie et al. 1996), dem DAG aktivierten TRPC6 (Hassock et al. 2002) oder dem Stim aktivierten Orai1 Kanal (Tolhurst et al. 2008), als auch aus internen Speichern

(Endoplasmatisches Retikulum) durch den IP₃ aktivierten IP₃R Kanal ins Cytosol. Der Anstieg der Ca²⁺ Ionen im Cytosol führt zur Formveränderung (shape change). Die Notwendigkeit von Calcium-Ionen zur Aktivierung von Thrombozyten aber auch in weiteren Schritten der Gerinnungskaskade wird in der Medizin genutzt, um Blutproben zu antikoagulieren, indem Ca²⁺ Ionen z.B. mittels EDTA oder Citronensäure komplexiert werden und für die Hämostase nicht mehr zur Verfügung stehen.

Die Aktivierung der Thrombozyten kann in vitro auch durch Zugabe einer der aktivierenden Substanzen (wie Kollagen, ADP, Thrombin) ausgelöst werden. Die dabei fehlende Adhäsion ans Endothel unterbindet nicht die Formveränderung und Aggregation.

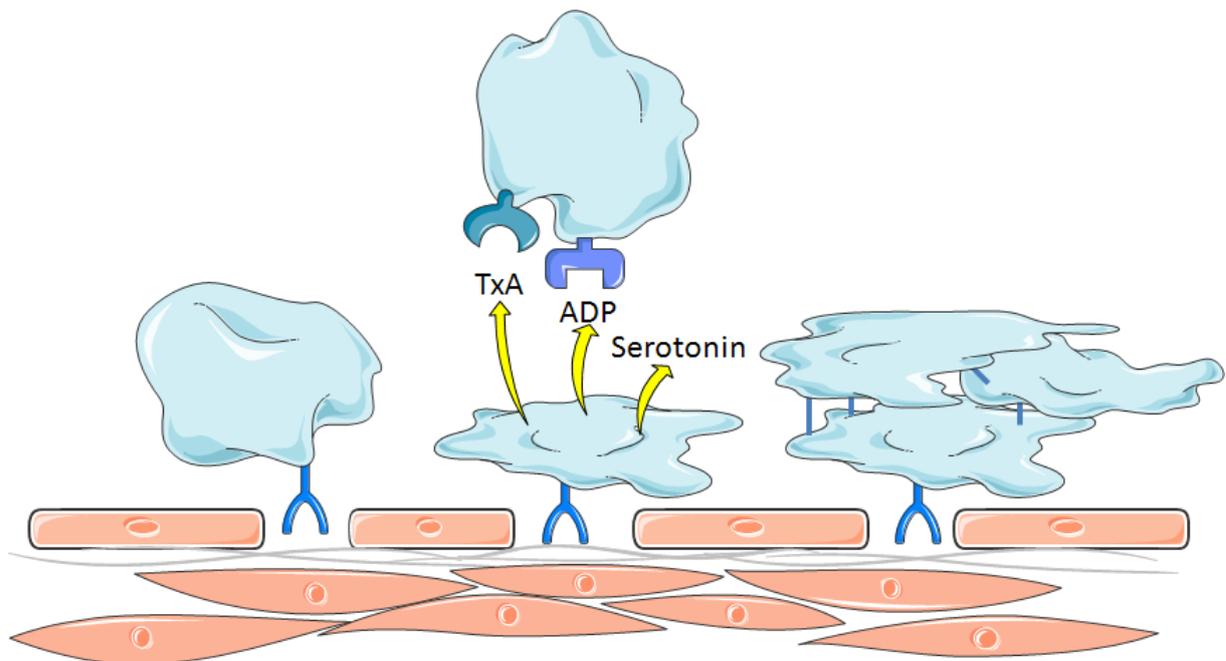


Abbildung 1.2: Thrombozyten-Aktivierung in vivo

Thrombozyten-Adhäsion an die subendotheliale Matrix, Formveränderung inkl. Ausschüttung diverser Substanzen zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten, Aggregation der Thrombozyten zur Verschließung der Endothelverletzung (von links nach rechts). (Bild wurde erstellt mit Komponenten aus Servier Medical Art, www.servier.com)

1.3 Rolle der Thrombozyten in verschiedenen Krankheitsbildern

Die häufigste Todesursache in Deutschland sind Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Im Jahr 2008 lag bei 43 % aller Verstorbenen eine solche Krankheit vor. Insgesamt 62.670 Menschen erlagen dabei einem Herzinfarkt. Dies entspricht 17,2 % der Herz-/Kreislauf-Todesfälle in Deutschland (Statistisches-Bundesamt 2009). Ein Herzinfarkt wird fast immer durch eine plötzliche Minderdurchblutung eines Herzkranzgefäßes ausgelöst, welche auf eine atherosklerotische Gefäßverengung mit zusätzlicher Thrombusbildung (Koronarthrombose) zurückzuführen ist. Neben dem finalen Verschluss des Gefäßes durch einen Thrombus sind nach neuesten Erkenntnissen Thrombozyten aber auch an der Entstehung der Atherosklerose selbst beteiligt (Jennings 2009).

Turbulenter Blutfluss kann zum Adhären von Thrombozyten an das intakte Endothel führen und eine erste Aktivierung auslösen (Theilmeier et al. 2002; Jorgensen 2005). Des Weiteren adhären Thrombozyten an entzündete Endothelzellen, welche prothrombotische Substanzen ausschütten (Gawaz et al. 1996; Gawaz et al. 1997; Bombeli et al. 1998; van Hinsbergh 2001). Derartig aktivierte Thrombozyten setzen unter anderem Plättchen Faktor 4 (PF4) und CD40L frei. Dabei ist CD40L ein Ligand für CD40 Rezeptoren auf Endothelzellen, wodurch Signalwege der Entzündung in den Endothelzellen angetriggert werden (Henn et al. 1998). Eine weitaus größere Rolle für die Bildung der Atherosklerose spielen jedoch die von den Thrombozyten ausgeschütteten Chemokine, zu denen auch der oben genannte PF4 gehört (Weber 2005). Diese locken Monozyten an, welche in das Gewebe einwandern und sich zu schwammartigen Makrophagen ausdifferenzieren (Libby et

al. 1991; Scheuerer et al. 2000). Diese Einlagerung führt zur Verengung des Blutgefäßes und zur Bildung des Plaque.

Dass nicht die Entzündung der Endothelzellen sondern die Aktivierung der Thrombozyten eine maßgebliche Rolle bei der Ausbildung der Atherosklerose spielt, konnte durch diverse Experimente mit Knock-Outs von verschiedenen Rezeptoren gezeigt werden. Ein Knock-Out des GPIIb stoppte die Entstehung einer Atherosklerose (Massberg et al. 2005). Ebenso reduzierte der Knock-Out von P-Selectin die Ausbildung einer Atherosklerose (Burger et al. 2003; Manka et al. 2004), wobei ein Doppel Knock-Out von P-Selektin und E-Selektin die Atherosklerosebildung am stärksten hemmte (Dong et al. 1998; Huo et al. 2003).

Ein daraus abgeleiteter möglicher Therapieansatz zur Reduktion atherosklerotischer Prozesse, wäre eine spezifische Hemmung bestimmter Thrombozytenaktivierungswege, welche über die Wirkung von niedrig-dosiertem Aspirin herausginge. Da Thrombozyten jedoch eine wichtige Rolle in der Hämostase spielen, wäre eine zu starke Hemmung fatal. Daher ist es von großer Bedeutung die einzelnen Mechanismen der Aktivierung und Hemmung von Thrombozyten zu kennen, um passende Therapieansätze für eine regulierte Hemmung zu finden.

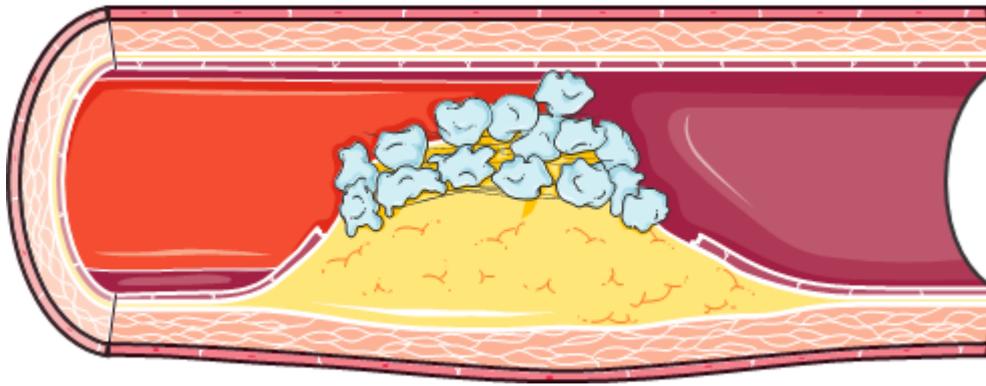


Abbildung 1.3: Thrombozyten-vermittelter Gefäßverschluss nach rupturiertem Plaque (Bilder wurden erstellt mit Servier Medical Art, www.servier.com).

1.4 Endogene Hemmung von Thrombozyten in gesunden Blutgefäßen

Im gesunden Gefäßsystem setzen Endothelzellen antithrombogene und vasoaktive Substanzen frei. Hierzu zählen maßgeblich Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂), aber auch Adenosin (Moncada et al. 1976a; Gryglewski et al. 1978; Palmer et al. 1987; Vinten-Johansen et al. 1999). Diese Substanzen wirken zum einen am Endothel und bewirken eine Vasodilatation, zum anderen wirken sie an Thrombozyten, wo sie einer Aktivierung entgegensteuern (Moncada et al. 1976a; Busse et al. 1987). Dabei aktiviert NO die Guanylatzyklase, welche cGMP produziert, und PGI₂ die Adenylatzyklase, welche cAMP produziert. Sowohl cGMP als auch cAMP aktivieren den Calcium-Transporter am dichten tubulären System wodurch Ca²⁺ aus dem Cytosol in dichte Granula (einen intrazellulären Speicher) transportiert wird. Durch die Wegnahme der Calcium-Ionen aus dem Cytosol können diese nicht mehr zur Aktivierung der Thrombozyten beitragen (Abbildung 1.4).

Im Gegensatz zu gesunden Gefäßen liegen in pathophysiologisch veränderten Gefäßen diese Substanzen in verminderter Menge vor, was zu vermehrten Adhäsionen von Thrombozyten ans Endothel führt.

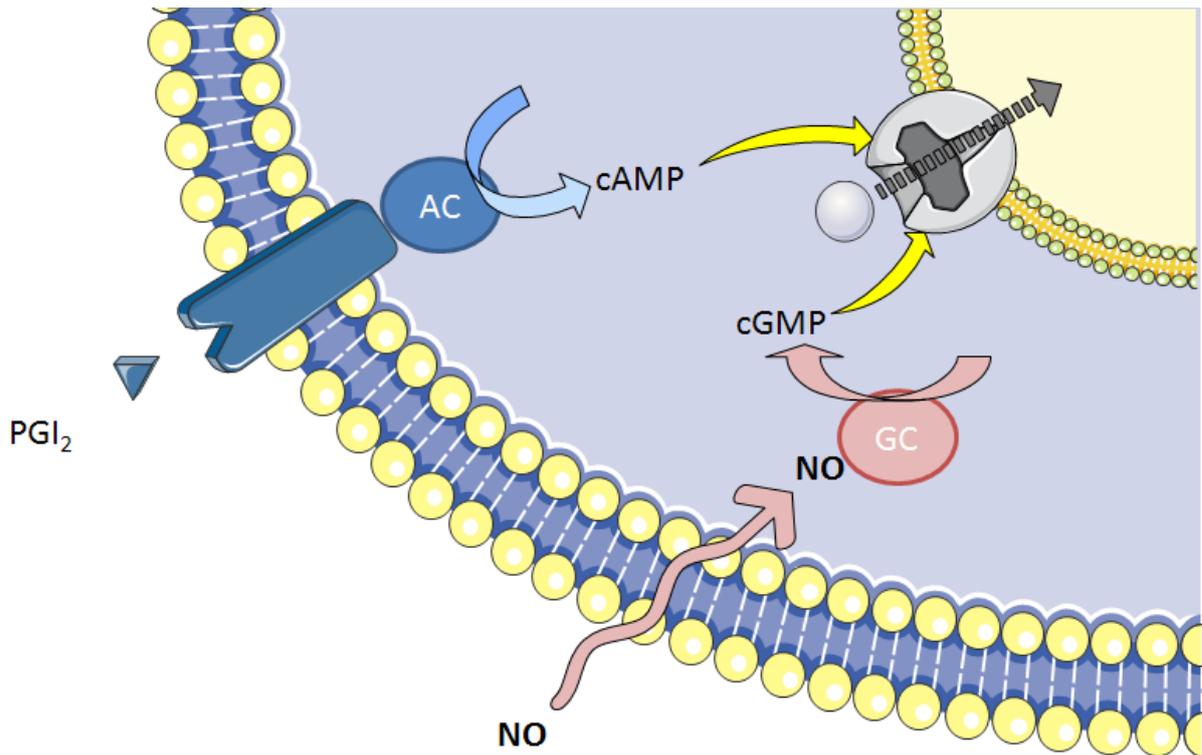


Abbildung 1.4: Endogene Hemmung der Thrombozyten durch Prostacyclin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO).

Beide Substanzen aktivieren über die Adenylat- (AC) bzw Guanylatzyklase (GC) unter anderem den Calcium-Transporter, welcher Calcium-Ionen aus dem Cytosol in intrazelluläre Speicher (dichte Granula) transportiert (Bilder wurden erstellt mit Servier Medical Art, www.servier.com).

1.5 Rolle des EDHF für die Thrombozytenfunktion

Eine dritte, von den Endothelzellen ausgehende vasoaktive Substanz ist der Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF). Er bewirkt eine Hyperpolarisation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen, wodurch es zur Vasodilatation kommt. Um welche Substanz genau es sich bei EDHF handelt und welche Proteine, Enzyme, Substanzen und Rezeptoren in die Signalwege involviert sind, ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Feletou et al. 2006) und unterscheidet sich wahrscheinlich abhängig von Spezies und Gefäßbett, so dass man auch von einem „Prinzip“ einer EDHF-artigen Wirkung sprechen kann. Diskutiert werden Produkte der Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP450), die Epoxyeicosatrienoische Säuren (EET), sowie Kalium-Ionen und deren Kanäle, da das Ausströmen von Kalium-Ionen zu einer Hyperpolarisation führt. Weitere diskutierte Substanzen sind die Produkte der Lipoxygenasen, Wasserstoff-Peroxid und C-type natriuretische Peptide (Feletou et al. 2006). Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Substanzen handelt.

Die verschiedenen Produkte der CYP450 wurden bereits in Zusammenhang mit Endothel-abhängiger Hyperpolarisation und Vasodilatation in verschiedenen Blutgefäßen diskutiert (Oltman et al. 1998; Widmann et al. 1998; Quilley et al. 2000; Fleming 2004). Die Ausschaltung der CYP450 2C9 (CYP2C9) Expression zeigte entsprechend einen Wegfall einer EDHF-abhängigen Ca^{2+} Änderung und Vasodilatation (Bolz et al. 2000). Dabei aktivierten EETs Kalzium-abhängige Kaliumkanäle (KCa) in der Zellmembran (Li et al. 1997). Insgesamt gibt es 8 verschiedene KCa Kanäle (KCa1.1, KCa2.1, KCa2.2, KCa2.3, KCa3.1, KCa4.1, KCa4.2 und KCa5.1) wobei letztere drei zwar strukturell ähnlich aber nicht von Kalzium aktivierbar sind (Gutman et al.; Wei et al. 2005). Am Endothel konnte in Mäusen bereits gezeigt werden,

dass das Fehlen von KCa3.1 (Intermediärer Calcium-abhängiger Kaliumkanal) zu einer verminderten Acetylcholin-abhängigen Dilatation führt (Si et al. 2006). Ebenso ist dieser Kanal in die EDHF typische Weiterleitung der Hyperpolarisation entlang des mikrovaskulären Gefäßes involviert (Wofle et al. 2009).

Ungeklärt ist bisher jedoch, ob diese dritte Substanz, EDHF, wie auch NO und PGI₂ eine antithrombogene Wirkung besitzt.

An Thrombozyten konnte eine Hyperpolarisation durch EETs gezeigt werden (Krötz et al. 2004). Untersuchungen mit dem EDHF-enthaltenden Überstand von kultivierten humanen Umbilical-venösen Endothelzellen (HUVEC) auf humane Thrombozyten zeigten, dass diese eine hyperpolarisierende Wirkung auf Thrombozyten haben. Diese Hyperpolarisation konnte unterdrückt werden, wenn die Thrombozyten mit Charybdotoxin, einem Hemmstoffen für die Kalium-Kanäle KCa3.1 (IKCa) und KCa1.1 (BKCa), behandelt wurden (Krötz et al. 2009). Eine spezifische Zuordnung war jedoch nicht möglich, da Charybdotoxin auch spannungsabhängige K-Kanäle hemmt. Daraus ergab sich bereits die Vermutung einer EDHF Wirkung auf Thrombozyten und die Beteiligung von thrombozytären KCa3.1 Kanälen an der EDHF-Signalkaskade.

1.6 Kaliumkanäle und deren Expression auf Thrombozyten

Es gibt viele verschiedene Kaliumkanäle, die in die folgenden Gruppen eingeteilt werden: Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv), einwärts-gerichtete Kaliumkanäle (Kir), 2 Poren Kaliumkanäle (2PK), ATP abhängige Kaliumkanäle (KATP) und Kalzium-abhängige Kaliumkanäle (KCa). Letztere werden nach deren Leitfähigkeit unterteilt in small KCa (SKCa, KCa2.3), intermediate KCa (IKCa, KCa3.1) und big KCa (BKCa, KCa1.1). Das Vorhandensein von Kv und KCa Kanälen auf Thrombozyten wurde mittels Patch-Clamp-Technik und pharmakologischen Hemmstoffen bereits in den 1990ern gezeigt (Mahaut-Smith et al. 1990a; Mahaut-Smith 1995; de Silva et al. 1997). Aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften wurde aber davon ausgegangen, dass es sich um KCa Kanäle intermediärer Leitfähigkeit handeln könnte. Die Internet-basierte Datenbank „Platelet Web“ über Proteine in Thrombozyten (Dittrich et al. 2008) hat bislang nur 5 Kaliumkanäle in Thrombozyten gelistet, davon nur ein KCa Kanal (*KCNN3*, potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3). An Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass KCa3.1 Kanäle (*KCNN4*) durch Kalium-Ausstrom zu einer Hyperpolarisation beitragen (Si et al. 2006). Ob dieser Kanal auch auf Thrombozyten vorhanden ist und welche Rolle er in Bezug auf die Thrombozytenaktivität hat, war bislang allerdings noch ungeklärt.

2 Fragestellung

Ein an der EDHF-Antwort an Endothelzellen beteiligtes Protein ist der KCa3.1 Kanal (Si et al. 2006). Wenn EDHF auch an Thrombozyten wirkt, könnte dieser oder ein ähnlicher Kanal auch auf Thrombozyten vorhanden sein und eine ähnliche Wirkweise besitzen. Untersuchungen mittels Patch-Clamp-Technik sowie mit pharmakologischen Hemmstoffen, wie Charybdotoxin (hemmt KCa3.1 und KCa1.1 Kanäle), an Thrombozyten lassen auf die Expression von KCa Kanälen intermediärer Leitfähigkeit in der Thrombozytenmembran schließen (Mahaut-Smith 1995; de Silva et al. 1997). Jedoch ist unklar, inwieweit die KCa Kanäle auf die Aktivität der Thrombozyten Einfluss haben. Kaliumkanäle sind selektiv permeabel für Kalium und da die Kaliumkonzentration im Thrombozyten höher ist als im umgebenden Plasma würde ein Öffnen des Kanals das Ausströmen von Kalium entlang des Elektrochemischen Gradienten bewirken. Ein K^+ Ausstrom führt zu einer Erniedrigung des Membranpotentials im Thrombozyten (Hyperpolarisation) und müsste damit einer Aktivierung entgegenwirken.

Aus diesen Überlegungen wurden folgende Fragestellungen innerhalb dieser Arbeit behandelt:

1. Ist KCa3.1 in Thrombozyten vorhanden?
2. Sind KCa3.1 Kanäle am Membranpotential von Thrombozyten beteiligt?
3. Führt eine Ausschaltung des Kanals zu einer Veränderung der Rezeptorexposition?
4. Was ist die funktionale Konsequenz *in vitro* bei Ausschaltung der Expression?
5. Welches ist die physiologische Konsequenz *in vivo* bei Ausschaltung der Expression?

3 Material und Methoden

Alle hier vorgestellten Experimente wurden im Institut für Vegetative Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU, seit 2008 Walter-Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin) in München unter der Leitung von Prof. Dr. U. Pohl durchgeführt.

Alle hier verwendeten Substanzen, wenn nicht explizit anders genannt, sind von Applichem (Deutschland).

3.1 Tiermodell

Es wurden adulte Black6 Wildtyp (Wt) Mäuse (*Mus musculus*) im Gewichtsbereich von 20 - 30 g beiderlei Geschlechts von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) sowie daraus abstammende Zuchttiere genutzt. Des Weiteren wurden KCa3.1 KO Mäuse aus hauseigener Zucht verwendet. Die KCa3.1 KO Mauslinie wurde vom Labor Köhler (Dr. Ralf Köhler, Pharmakologie, Universität Californien Davis, USA) generiert (Si et al. 2006) und uns zur Zucht zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden bei 21 - 24°C in einem 12 stündigen Hell-Dunkel-Zyklus bei freiem Trockenfutter und Wasserzugang nach Geschlecht getrennt gehalten. Die Käfige wurden täglich von Tierpflegepersonal des Instituts gesäubert.

3.2 Narkose

Ein Narkosemix bestehend aus 160 µl Fentanyl (0,05 mg/ml, CuraMED[®] Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 800 µl Midazolam-ratiopharm[®] (1 mg/ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), 80 µl Domitor[®] (1 mg Medetomidinhydrochlorid / 10 ml, Orion Pharma Corp., Espoo, Finnland) und 2960 µl 0,9% Kochsalzlösung wurde hergestellt und bei 4°C maximal 1 Woche gelagert.

Am Ende der Versuche wurden die Mäuse mit einer Überdosis Natrium-Pentobarbital (Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) eingeschläfert.

3.3 Isolierung und Reinigung von Thrombozyten

Thrombozytenresuspensionspuffer

138 mM NaCl

2,7 mM KCl

12 mM NaHCO₃

0,4 mM NaH₂PO₄

1 mM MgCl₂

5 mM D-Glucose

5 mM HEPES

pH 7,35

Natrium-Citrat-Glucose für murine Blutentnahme

38 mM Natrium-Citrat

75 mM Trinatrium Citrat

100 mM D-Glucose

Für die Isolierung von Thrombozyten aus der Maus, wurden adulte Mäuse beiderlei Geschlechts mit 15 µl Narkosemix /g Körpergewicht anästhesiert. Nach Reflexfreiheit wurde durch Herzpunktion mit einer Kanüle der Stärke 27 ³/₄ (B.Braun, Melsungen, Deutschland) zwischen 500 und 1000 µl Blut entnommen. Nach Blutentnahme wurden die Tiere mit einer Überdosis Natrium-Pentobarbital eingeschläfert.

3.3.1 Thrombozytenisolierung für Aggregationsuntersuchung in vitro

Zur Gerinnungshemmung wurden 40 µl Natrium-Citrat-Glucose, 60 µl Thrombozytenpuffer in eine 1ml Spritze vorgelegt und mittels Herzpunktion 500µl Blut entnommen. Das Citrat-Blut wurde in einem Röhrchen (5 ml, 75 x 12 mm, PS, Ref 55.1579, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 400 µl Thrombozytenpuffer versetzt und für 5 min bei 130 g bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse in einer Eppendorf-Zentrifuge (5810R mit Ausschwingrotor, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. 250 µl des plättchenreichen Plasma (PRP) wurden mit einer weitlumigen Pipette abgenommen und in eine Glasküvette (Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Osburg, Deutschland) überführt. Das restliche Citrat-Blut wurde erneut für 5 min bei 3000 g zentrifugiert. Es wurden 250 µl des Überstands (Plättchen-armes Plasma) in eine weitere Glasküvette überführt. Beide Glasküvetten wurden für die Aggregationsuntersuchung mittels Turbidometrie verwendet.

3.3.2 Thrombozytenisolierung und Färbung für in vivo Versuche

Bei Mäusen wurde bis zu einem Volumen von 1 ml die maximal mögliche Menge Blut entnommen. Die Blutgerinnung wurde durch Vorlage von 200 µl Citrat-Glucose-Lösung und 1 µl Iloprost (Prostazyklinanalogon Ilomedin®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) unterbunden. Das Citratblut wurde in 5ml Röhrchen (Sarstedt, 5 ml, 75 x 12mm, PS, Ref 55.1579) mit 500 µl PBS⁻ gegeben und 5min mit 125 g bei RT ohne Bremse zentrifugiert (5810R mit Ausschwingrotor, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das plättchenreiche Plasma wurde mit einer weitlumigen Pipette vorsichtig abgenommen und in 2 ml Thrombozytenpuffer mit 5µl Iloprost und 0,5 µl CFDA-SE (89,7 mM, Bachem) überführt und für 30 min lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Die Thrombozytenlösung wurde gleichmäßig auf 6 neue Röhrchen verteilt und 10 min mit 332 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen, die Thrombozyten in insgesamt 250 µl Thrombozytenpuffer resuspendiert und für *in vivo* Versuche verwendet.

3.3.3 Isolierung von Thrombozyten zur Herstellung von Proteinlysat

Die Blutentnahme und Zentrifugationsschritte wurde wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Jedoch wurde das PRP nicht mit CFDA-SE inkubiert. Das Thrombozytenpellet wurde in insgesamt 50µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 2 mM DTT, 10 µl/ml Proteinase-Inhibitoren-Mix P8340 von Sigma-Aldrich, München, Deutschland) resuspendiert und mehrfach durch eine Insulinkanüle (27³/₄ G) gezogen um die Zellen zusätzlich mechanisch aufzuschließen.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Proteinisolation aus Thrombozyten

Thrombozyten aus Wt und KCa3.1-KO Mäusen wurden isoliert und gewaschen wie in 3.3.3 beschrieben und in 50 µl Lysispuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Ziehen durch eine 29G Kanüle homogenisiert. Mit dieser homogenen Lösung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

3.4.2 Proteinbestimmung (nach Biuret)

BCA Protein-Assay Kit bestehend aus Lösung A und Lösung B (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

BSA (Bovine Serum Albumin) Lösung 2 mg/ml in destilliertem Wasser

Das BCA (bichinonic acid) Kit basiert auf der Reaktion nach Biuret. Hierbei werden Cu^{2+} Ionen durch Proteine in alkalischem Milieu zu Cu^{1+} reduziert. BCA bindet an Cu^{1+} und bildet einen blau-violetten Komplex. Diese Reaktion ist annähernd linear proportional zur ansteigenden Proteinkonzentration. 10 µl Thrombozytenlysate und 200 µl BCA-Kit Lösung wurden in eine 96-Well Platte gegeben. Parallel wurde eine Eichreihe aus 1-20 µg BSA-Lösung pro Well erstellt. Nach Inkubation der Lösungen für 30 min bei 37°C wurden diese kolometrisch in einem SPECTRAFLUOR (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 550 nm gemessen. Der Proteingehalt der Thrombozytenlysate konnte über die Eichreihe mit Hilfe der Formel $f(x)=mx+b$ mit $f(x)$ als die Absorptionsrate, x als den Proteingehalt in µg, m der Gradient der Standardkurve und b der Achsenabschnitt der Standardkurve, errechnet werden.

3.4.3 SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Trenngel (8%)

12,08 ml	Aqua destillata
6,25 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
6,67 ml	Acrylamid
125 µl	20% Natriumdodecylsulfat (SDS)
12,5 µl	TEMED
250 µl	10% Ammoniumpersulfat

Sammelgel (4%)

4,375 ml	Aqua destillata
6,25 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
1,875 ml	Acrylamid
125 µl	20% Natriumdodecylsulfat (SDS)
7,5 µl	TEMED
125 µl	10% Ammoniumpersulfat

Die Reaktionsansätze für Trenngel und Sammelgel wurden nach Zugabe von Aqua destillata, Tris-HCl und Acrylamid gut durchmischt und entgast. Anschließend wurden SDS, TEMED und Ammoniumpersulfat zugegeben. Die Flüssigkeit wurde möglichst zügig in die Gelhalterung gegossen, wo sie bei RT polymerisierte.

4x Ladepuffer

0,25 M	Tris-HCl pH 6,8
8%	SDS
40%	Glycerin
0,02%	Bromphenolblau
400 nM	β -Mercaptoethanol

4x Laufpuffer

134 mM	Tris
760 mM	Glycin
0,4 %	SDS
pH 8,8	

Die Proteinlysate wurden für kurze Zeit bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Es wurden Proteinlysate entsprechend 40 μ g Protein mit Ladepuffer gemischt, 10 min bei 99°C denaturiert und auf das Gel bestehend aus 4 %igem Sammelgel und anschließendem 8%igem Trenngel aufgetragen. An das Gel wurde eine Spannung von 90 V angelegt bis der Ladepuffer das Ende des Sammelgels erreicht hatte und anschließend 130 V bis der Ladepuffer das Ende des Trenngels erreicht hatte.

3.4.4 Western - Blotting

10x Transferpuffer

386 mM Glycin

368 mM Tris-HCl

0,375 % SDS

Zum Gebrauch wurde die Lösung wie folgt verdünnt: 100 ml 10x Transferpuffer, 200 ml Ethanol, 800 ml Aqua destillata

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Tank-Western-Blotting elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (Applichem) transferiert. Hierzu wurde das Gel zusammen mit der Nitrocellulose-Membran luftblasenfrei zwischen zwei Filterpapiere gelegt und die Proteine in einer gekühlten Tank-Blot-Kammer mit Transferpuffer bei 200 mA (entsprechend Fläche des Gels mal 0,8 mA) über 75 min aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran transferiert.

3.4.5 Färbung von Proteinen

Um die Proteinmenge der verschiedenen aufgetragenen Proben kontrollieren zu können, wurde die Nitrocellulose-Membran 5min in Ponceau S Lösung (Sigma-Aldrich) inkubiert. Anschließend wurde die Hintergrundfärbung durch Waschen mit H₂O entfernt. Die gefärbte Nitrocellulose-Membran wurde mit einer handelsüblichen Digitalkamera (Nikon CoolPix) dokumentiert.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Immunoprint für KCa3.1

10x Waschpuffer TBS (Tris buffered saline) mit Tween

153 mM Tris

1,37 M Natriumchlorid

0,1 % Tween 20

Blocking Puffer

5% Magermilch-Pulver in TBS-Tween

Chemielumineszenz- Detektionskit (Applichem, Darmstadt, Deutschland)

Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 gemischt

Die Detektion des KCa3.1 Proteins erfolgte mittels spezifischem Antikörper. Um unspezifische Reaktionen ausschließen zu können, wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst 30 min mit Blocking Puffer bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Erstantikörper, polyklonal Hase-anti-Maus KCa3.1 N-terminal (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Köhler, Zentrum für Innere Medizin, Marburg), im Blocking Puffer 1:200 verdünnt und über Nacht bei 4°C auf der Nitrocellulose-Membran inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde 3 mal in Waschpuffer für jeweils 5 min bei RT gewaschen. Der Zweitantikörper, Ziege-anti-Hase (Calbiochem, Merck-Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland) gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, wurde 1:10.000 in Blocking Puffer verdünnt und 1h bei RT auf der Nitrocellulose-Membran inkubiert. Die Membran wurde

3mal in Waschpuffer jeweils 5 min gewaschen. Es wurden 50 bis 100µl Entwicklerlösung auf der Membran verteilt und 1 bis 2 min inkubiert. Die Membran wurde zwischen zwei Folien gelegt und die überschüssige Entwicklerlösung herausgestrichen. Die Chemielumineszenz wurde mit einem digitalen Dokumentationssystem (Wasabi, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Deutschland) dokumentiert.

Als Ladekontrolle wurde der Blot mit Ponceau S (Sigma-Aldrich) gefärbt, wobei alle Proteine auf der Membran eine Färbung erhalten. Die Banden auf gleicher Höhe können auf ihre Dicke miteinander verglichen werden.

3.6 Hämatologische Untersuchungen

Narkotisierten Wt- und KCa3.1 KO Mäusen wurde 2 mm der Schwanzspitze abgeschnitten und aus der sich ergebenden Wunde wurden 50 bis 100 µl Blut in ein EDTA benetztes Röhrchen (Microvette®100 Sarstedt AG&Co., Nümbrecht) aufgefangen. Das EDTA-Blut wurde in einem Coulter Ac.Tdiff (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) gemessen (Einstellung Pferd) und ein kleines Blutbild erstellt.

3.7 Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer ermöglicht die Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzemission einer Zelle. Hierzu werden suspensierte Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einen Laserstrahl mit der Wellenlänge $\lambda=488$ nm bzw. $\lambda=633$ nm. Die durch die Zellen erzeugte Lichtstreuung sowie die durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen an den Zellen erzeugte Emission wird detektiert und erlaubt Rückschlüsse auf die Größenverteilung, die Körnigkeit der Zellen sowie die emittierte Lichtintensität in verschiedenen Emissionsspektren. In dieser Arbeit wurde die Lichtemission im Bereich $\lambda=515-545$ nm und $\lambda=650-670$ nm detektiert. Im Durchflusszytometer ist die Messung mehrerer tausend Zellen innerhalb von Minuten möglich. Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer ist ein FACS Canto II von Becton Dickinson (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Daten wurden mit der Software Diva (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) erfasst und ausgewertet.

3.7.1 Thrombozytäres Membranpotential

Membranpotential-sensitive Farbstoffe werden zur Untersuchung der Änderung des transmembranären elektrischen Potentials von Zellen genutzt, die durch Änderung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes angezeigt wird. In dieser Arbeit wurde hierzu Bis- [1,3-dibutylbarbituric acid] trimethine oxonol (DiBAC₄(3), Bis-oxonol, Molecular Probes, Deutschland) verwendet, welches ein Emissionsmaximum bei $\lambda=516$ nm hat. Der anionische Farbstoff diffundiert in die Zelle und bindet intrazellulär an Proteine und Membranen, wodurch die Intensität seiner Lichtemission erhöht wird (Waggoner 1976). Die Menge an in die Zelle aufgenommenem Farbstoff korreliert mit der Höhe des Membranpotentials. Sinkt das Membranpotential einer Zelle, so diffundiert der Farbstoff wieder aus ihr hinaus und die

Lichtemissionsintensität der Zelle sinkt. Eine Änderung des Membranpotentials der Zelle korreliert mit der Menge an aufgenommenem Farbstoff und bewirkt damit eine Änderung der Fluoreszenzintensität der Zellen (Brauner et al. 1984; Bronner et al. 1991). Eine Zelltoxizität von Bis-oxonol ist bisher nicht beschrieben.

Die Membranpotentialmessungen wurden an Thrombozyten von Wt und KCa3.1-KO Mäusen durchgeführt. Hierzu wurde je 5 µl Citratblut (inkl. 200 µl Citrat-Glucose) sofort nach Entnahme in 1 ml 1 %iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert und mit 500 nM DiBAC₄(3) für 30min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der Thrombozyten wurde in einem Durchflusszytometer gemessen.

Da eine Eichung mit murinen Thrombozyten zur Umrechnung in mV wegen der zu geringen Blutvolumens nicht möglich war, sind die gemessenen Fluoreszenzwerte als Absolutwerte angegeben. Um eine annähernde Umrechnung in mV zu ermöglichen, wurde eine Eichgerade von menschlichen Thrombozyten verwendet, welche mittels Valinomycin-Methode erstellt wurde (Krötz et al. 2004). Durch Resuspension der Thrombozyten in verschiedenen mM Kaliumkonzentrationspuffern und durch Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin lässt sich mittels Fluoreszenzsignal durch DiBAC₄(3) eine Eichgerade ermitteln mit deren Hilfe und der Nernst-Gleichung sich die Veränderung des Membranpotentials errechnen lässt.

3.7.2 Rezeptorexposition auf Thrombozyten

Narkotisierten Wt und KCa3.1 KO Mäusen wurde mittels Herzpunktion Blut entnommen. Dabei wurden 100 µl Citrat-Glucose in eine Spritze vorgelegt und bis zu einem Volumen von 1 ml die maximale Menge Blut entnommen.

Jeweils 5 µl Citrat-Blut wurden mit 1ml kalter 1 %iger PFA-Lösung fixiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Detektion der Rezeptoren wurden 10 µl Hamster-Anti-MausCD61-Alexa647 (AbD Serotec Morphosys AG, Martinsried, Deutschland) bzw. 5 µl Ratte-Anti-MausCD62P-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) bzw 5µl Hamster-Anti-Maus-CD42d (BD Pharmingen) und 5µl Ziege-Anti-Hamster-APC (Caltag Laboratories GmbH, Hamburg, Deutschland) zu jeweils 5 µl Citrat-Blut gegeben und direkt im Anschluss mit PFA-Lösung fixiert und 30min bei 4°C inkubiert.

3.8 Aggregometrie

Zur Aggregationsmessung wurden 500 µl Blut entnommen, in insgesamt 500 µl Na-Citrat-Thrombozytenpuffer verdünnt, so dass im plättchenreichen Plasma (PRP) eine Endkonzentration von ca. 450.000 Plättchen/µl erreicht wurde. In jede Turbidometrie-Glasküvette mit PRP wurde ein Magnetrührstäbchen zugegeben. Es wurde jeweils eine Glasküvette mit Wt-Thrombozyten und eine Glasküvette mit KCa3.1 KO Thrombozyten in zwei parallele Messstationen des Aggregometers (Chrono-Log Corporation, Havertown, USA) gestellt und 2 min bei 37°C äquilibriert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Magnetrührer im Gerät angeschaltet (1000 U/min), die Messung mit der Software Aggrolink (Chrono-Log Corporation, Havertown, USA) wurde gestartet und in jede Glasküvette wurde 1 µM, 3 µM oder 10 µM Adenosindiphosphat (ADP, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugegeben. Als Referenz (entsprechend 100% Aggregation) wurde plättchenarmes Plasma des jeweils gleichen Tieres verwendet. Die Auswertung erfolgte direkt in der Messsoftware Agrolink bei 5 min nach Zugabe des ADP. Die Daten wurden in % der maximal erreichbaren Aggregation sowie als Slope-Wert angegeben.

3.9 Chirurgische Techniken

3.9.1 Rückenhautkammermodell

Als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung und Beobachtung der Blutgefäße in der Mikrozirkulation der Rückenhaut diente die Rückenhautkammer, welche am Institut für Chirurgische Forschung der LMU München entwickelt wurde (Endrich et al. 1980). Die Technik dieses Modells wurde bereits vielfach angewendet und ist international hinsichtlich mikrozirkulatorischer Untersuchungen etabliert.

Zur Implantation der Rückenhautkammer wurden die Versuchstiere intraperitoneal mit einer Narkoselösung narkotisiert (siehe Abschnitt 3.2). Mit einem Langhaarschneider (Aesculap® AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) wurden die Haare an Rücken und Seiten des Tiers abrasiert. Anschließend wurden die rasierten Stellen angefeuchtet und mit PILCA Enthaarungscreme (Glaxo Smith Kline Consumer Healthcare GmbH & Co.KG, Bühl, Deutschland) vollständig enthaart. Die Rückenhaut wurde mit handwarmem Wasser gründlich gereinigt und mit einem Tuch getrocknet. Durch Transillumination der vom Körper nach dorsal hochgezogenen Rückenhaut ließ sich nun die Struktur und der Verlauf der subkutanen Arteriolen und Venolen beurteilen. Nach Ermittlung der mitsagittalen Linie der Rückenhaut wurde je nach Lage der Blutgefäße der rechte oder linke Hautteil lateral nach oben verschoben, so dass die gewünschten Hauptgefäße später im Bereich des Fensters der Rückenhautkammer zu liegen kamen. Die Haut wurde in dieser Stellung cranial und caudal der Rückenhautfalte mit zwei Fäden (5/0 geflochtene Seide, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) aufgespannt. Im Folgenden wurde die Implantation der Titan-Rückenhautkammer (Werkstatt, Institut für Chirurgische Forschung, München, Deutschland), welche aus zwei konvexen, spiegelbildlich gleich großen Titanplatten besteht (Abbildung

3.1A), vorgenommen. Das Präparierbesteck sowie die Rückenhautkammer wurden vor der Implantation sterilisiert. Der schraubenenthaltende Teil der Titan-Rückenhautkammer wurde an die rechte Hauthälfte angelegt, so dass das Fenster der Rückenhautkammer zwischen Spina scapulae (Schultergräte) und Os coxae (Hüftbein) 1/3 bis zur Hälfte caudal der Spina scapulae zu liegen kam, und mit zwei Fäden cranial und caudal der oberen Schraube an der Hautfalte fixiert. Die unteren Schrauben der Rückenhautkammer wurden nach Durchstechen der Haut mit einer Kanüle durch die Haut geführt und mit einer Klemme fixiert. Nach Desinfektion der Haut mit Kodan[®]-Spray (Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde der kreisrunde Bereich des Rückenhautkammerfensters auf der Haut markiert und das Tier in Seitenlage mit der noch freien Hauthälfte nach oben und dem Präparator zugewandt auf den Operationstisch gelegt. In der Markierung des Rückenhautkammerfensters wurden die Hautschichten bis zum M. cutaneus maximus der kontralateralen Hautseite mikrochirurgisch abpräpariert und damit die intakte Schicht der gegenüberliegenden Epidermis mit subkutanem Gewebe, versorgenden Gefäßen und dem M. cutaneus maximus zur Darstellung gebracht.

Nach Abschluss der chirurgischen Präparation wurde die kontralaterale Kammerhälfte aufgesetzt und mit drei Muttern an den drei Schrauben der gegenüberliegenden Kammerhälfte befestigt. Der Abstand der beiden Platten voneinander betrug 450 µm und wurde durch entsprechende Unterlegscheiben als Platzhalter gewährleistet. Der M. cutaneus maximus der Gegenseite schmiegte sich durch Adhäsionskräfte an das mit einem Sprengring fixierte Deckglas (Edgar Hefele Medizin-Technik, München, Deutschland) im Rückenhautkammerfenster an. Die Hautfalte wurde durch weitere zwei Haltefäden in den vorgesehenen Bohrungen am Kammerrand fixiert. Dadurch konnten die anliegenden Gefäße

des Musculus cutaneus maximus ständig makroskopisch als auch mikroskopisch beobachtet werden (Abbildung 3.1c).

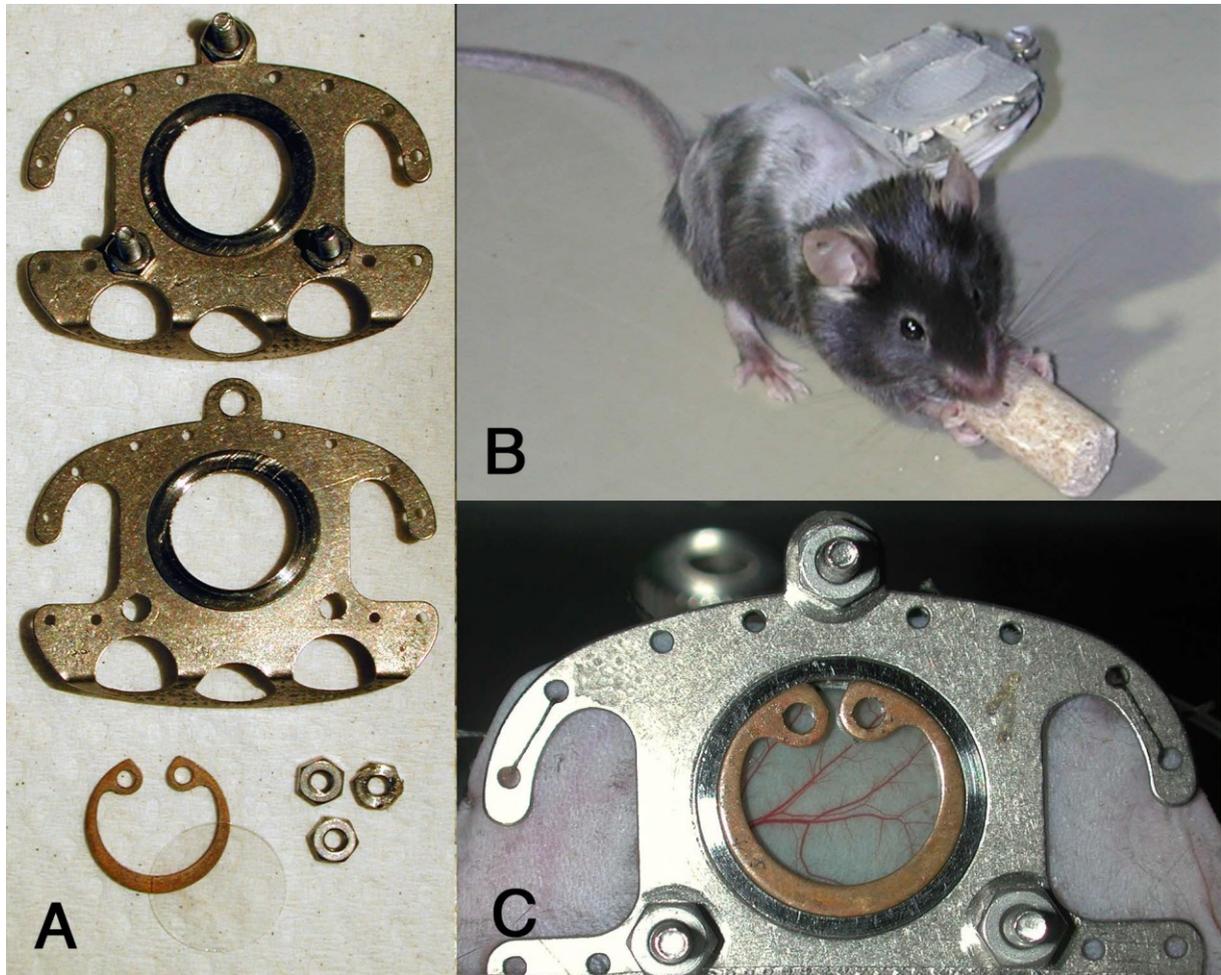


Abbildung 3.1: Rückenhautkammermodell

A: Einzelteile der Rückenhautkammer, Schrauben-enthaltende Hälfte (oben), zweite Hälfte der Rückenhautkammer, Sprengring, Deckglas, Schrauben-Muttern (v.l.n.r.) **B:** Rückenhautkammer an der Maus

C: Implantierte Rückenhautkammer mit intakter Mikrozirkulation.

3.9.2 Arterielle und venöse Katheterisierung

Ein bis drei Tage nach der Implantation der Rückenhautkammer wurden die Tiere intraperitoneal narkotisiert (siehe Abschnitt 3.2) und ein Verweilkatheter (Portex® Fine Bore Polyethylen, OD 0,61mm, ID 0,28mm, Schubert&Weiss, München, Deutschland) in die rechte Arteria Carotis communis implantiert. Der Polyethylenkatheter wurde gegebenenfalls vor Implantation über einer Flamme erhitzt und nach Schmelzen des Materials auf ungefähr die Hälfte des Außendurchmesser ausgezogen, um ein leichteres Einführen des Katheters in die A. carotis communis und eine stabilere Fixierung des Katheters im Gefäß durch die erhöhte Biegsamkeit zu gewährleisten.

Für die Implantation des Katheters wurden die Haare der Regio cervicalis anterior mit einem Langhaarschneider abrasiert und anschließend mit Enthaarungscreme vollständig enthaart. Es wurde ein ca. 1 cm langer Schnitt in cranial-caudaler Richtung ca. 1 mm parasagittal rechts gesetzt und die rechte A. carotis communis chirurgisch dargestellt.

Die A. carotis communis wurde cranial kurz vor der Aufzweigung in die A. carotis interna und externa mit einem Faden (5/0 Seide, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) abgebunden und ca. 6 mm weiter caudal mit einer Gefäßklemme verschlossen. Ungefähr ½ mm caudal des Fadens wurde das Gefäß eröffnet, der mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Katheter eingeführt und mit einem Faden provisorisch fixiert. Nach Öffnen der Gefäßklemme wurde der Katheter 5 mm weit in das Gefäß eingeführt und mit insgesamt zwei Fäden am Gefäß fixiert. Der cranial zum Abbinden des Gefäßes genutzte Faden wurde weiterhin zur zusätzlichen Fixierung des Katheters verwendet. Die Ausleitung des Katheters über einen subkutanen Hauttunnel in den Rücken der Tiere gewährleistete einen langfristigen Schutz vor mechanischer Manipulation und Entzündungen. Die Operationswunde wurde mit 3 bis 4 Fäden vernäht. Vor dem Erwachen der Tiere und nach

jedem einzelnen Versuchsvorgang wurde der extrakorporale Teil des Katheters am distalen Ende verknotet und verschlossen und mit Leukosilk an der Rückenhautkammer fixiert, wodurch die Tiere an einer Manipulation des Katheters gehindert waren.

Erfüllte die Präparation der Rückenhautkammer am darauffolgenden Tag die Kriterien einer intakten Mikrozirkulation (normaler Blutfluss, keine Entzündungszeichen wie gerötete Haut, vergrößerte und/oder geschlängelte Gefäße), so kam das Versuchstier für die anschließenden Versuche in Frage.

3.10 Intravitalmikroskopie

3.10.1 Material, technischer Aufbau des Arbeitsplatzes

Für die mikroskopische Beobachtung und Datenaquisition wurde ein von der Firma Zeiss speziell für unsere Zwecke angepasstes Intravitalmikroskop Zeiss „AxioTech Vario 100“ mit einer CCD Digitalkamera Zeiss „AxioCam H5m“ (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) verwendet (Abbildung 3.2). Das Mikroskop hat eine fiberoptische Durchlichtquelle, eine anregende Auflichtquelle (Quecksilberdampfampe), eine Zoomoptik (Video-Zoom 44 C1/3“ 0,33-1,6) vorgeschaltet zur Digitalkamera und einen manuell in zwei-dimensionalen Richtung (x-y-Richtung) beweglichen Mikroskopiertisch. Auf diesem konnte eine speziell angefertigte Halterung angebracht werden, worauf die wachen, nicht narkotisierten oder analgesiarten Tiere, immobilisiert in einer durchsichtigen Plastikröhre mit Luftlöchern gelegt wurden. Die Plastikröhre ist mit einem Schlitz versehen, wodurch die Rückenhautkammer außerhalb der Röhre zum Liegen kommt und mit einer Schraube für die Dauer der Beobachtung an der Halterung fixiert werden konnte.

Die mikroskopischen Aufnahmen der im Bereich des Rückenhautkammerfensters einzusehenden Arteriolen wurden unter Durchlicht oder Fluoreszenz (Filter 9: BP 450-490, FT 510, LP 515 oder Filter 44: BP 445/40, FT 500, BP 530/50 - Anregung, Strahlteiler, Emission - von Zeiss, Quecksilberdampfampe) erstellt. Die Beobachtung und Aufnahme der Gefäße wurde mit einem 20x Long-distance Objektiv gemacht. Das Video-Zoom war für Beobachtung an der Maus auf 0,5 eingestellt. Die Bilder wurden mit der CCD Kamera erfasst und über eine Fire-Wire Datenschnittstelle an ein Computersystem übertragen.



Abbildung 3.2: Intravitalmikroskop

bestehend aus einem x-y-Tisch mit Kleintierhalterung, dem Mikroskop „Axiotech Vario 100“, einem Zoom-Objektiv und einer Digitalkamer mit Dateninterface.

3.10.2 Digitale Datenaquisition

Die digitalen Bilddaten der Kamera wurden mit der Software AxioVision Version 4 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aquiriert. Für die Daten-Aquise mit AxioVision wurde eine Belichtungszeit von 69 ms verwendet, woraus sich ohne Verzögerung eine Bildrate von 14,5 Bilder/s ergab. Diese Einstellung wurde für die Untersuchung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion verwendet. Für die Untersuchung des Gefäßverschluss nach Gefäßverletzung wurde mit einer Verzögerung von 200 ms gearbeitet, woraus sich eine Bildrate von 5/s ergab. Es wurde keine Verstärkung und kein Binning verwendet.

3.10.3 Datenverarbeitung

Die Auswertung der Bilder und Film-Sequenzen erfolgte mit der Software AxioVision (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Für die Ermittlung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion wurde der absolvierte Weg der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten innerhalb der eingestellten Belichtungszeit markiert und vermessen. Je kürzer der hinterlegte Weg während der Belichtungszeit, als desto intensiver wurde die Thrombozyten-Endothel-Interaktion angenommen. Des Weiteren wurde der Gefäßdurchmesser vermessen. Die Größen wurden durch Angabe der Skalierung vom Programm errechnet. Die hieraus erhobenen Daten wurden in Excel (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und Sigma Plot 9.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) gesammelt, aufbereitet und graphisch dargestellt.

3.11 Intravitale Versuche

3.11.1 Thrombozyten-Endothel-Interaktion in vivo

Nach Implantation von Rückenhautkammer und Katheter, wurden der Maus ca. 10 µl ex vivo gefärbter muriner Thrombozyten (2 Mio/µl) über den Katheter infundiert. Es wurden jeweils 6 arterielle Abschnitte pro Tier aufgenommen und wie in Abschnitt 3.10.3 vermessen. Da diese allogenen transplantierten Thrombozyten nach ca. 10 min vom Retikuloendothelialen System aus dem Blutkreislauf entfernt waren, wurden die Messungen sofort nach Injektion durchgeführt. Zusätzlich wurden nach Bedarf weitere Thrombozyten injiziert. Die Geschwindigkeitsverteilung bezogen auf den schnellsten Thrombozyten pro Gefäßabschnitt wurde erstellt und als Histogramm dargestellt, wobei 20 Klassen entsprechend der Geschwindigkeitsverteilung aller Thrombozyten definiert wurden. Der Anteil der Thrombozyten, welcher sich innerhalb der Klasse der langsamsten Thrombozyten innerhalb eines Versuchs wiederfand, wurde als Anteil relevant mit dem Endothel interagierender Thrombozyten („Roller“) definiert und in % aller analysierten Thrombozyten innerhalb der Versuchsreihe dargestellt. Diese Anzahl der interagierenden Thrombozyten im Verhältnis zur Anzahl aller gezählten Thrombozyten in den verschiedenen Versuchsgruppen wurden miteinander verglichen. In jedem Tier wurden 6 Gefäßabschnitte analysiert, worin jeweils zwischen 100 und 120 Thrombozyten ausgewertet wurden.

Die Untersuchungen zum Einfluss des KCa3.1 Kanals auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion wurden an Wt und KCa3.1-KnockOut Mäusen durchgeführt. Dabei wurden Wt-Mäusen gefärbte Thrombozyten aus KCa3.1-KO Mäusen sowie KCa3.1-KO Mäusen gefärbte Wt-Thrombozyten infundiert. Als Kontrolle wurde die Interaktion von Wt-Thrombozyten in Wt-Mäuse verwendet.

3.11.2 Thrombusbildung nach Gefäßverletzung

In den Versuchen zum Thrombozyten-vermittelten Gefäßverschluss nach exogener Gefäßverletzung wurde zur besseren Beobachtung des Blutflusses den Mäusen 20 - 50 µl einer 5 %igen Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (150.000 g/mol, Sigma-Aldrich) Kochsalz-Lösung zur vollständigen in vivo Anfärbung des Plasmas der Tiere über den Katheter injiziert. Es wurde die Hauptarteriole innerhalb des Kammerfensters im Intravitalmikroskop mittels einer Digitalkamera avisiert und die Zeit ab Applikation von 20 µl Eisen-(III)-Chlorid-Lösung (FeCl_3) auf die Hautinnenseite bis zur Thrombusbildung und dem damit verbundenen Blutflussstop gefilmt. Der Zeitpunkt des Eintretens des Blutflussstops wurde als Gefäßverschlusszeit ermittelt. Die Eisenchloridmethode stellt eine etablierte Methode dar, wobei das Eisenchlorid die Formation freier Radikale bedingt welche das Endothel zerstören (Denis et al. 1998). War bis 6 min nach Applikation des FeCl_3 kein Gefäßverschluss durch Thrombusbildung eingetreten, wurde eine Zeit von 360 s notiert. Es wurden Versuchsgruppen von Wt-Mäusen und von KCa3.1-KO Mäusen durchgeführt.

3.12 Statistik

Alle Ergebnisse werden Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die Berechnungen und grafischen Darstellungen wurden mit SigmaPlot und SigmaStat durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden bei normalverteilten kontinuierlichen Variablen der student's t-test, bei gepaarten Versuchen der gepaarte t-test und bei Testung mehrerer normalverteilter, kontinuierlichen Variablen eine Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) verwendet.

Die Analyse des Blutbildes, der Thrombozyten-Größe, der Rezeptorexposition sowie des Gefäßverschluss wurde mit einem t-test durchgeführt, da es sich hier um normalverteilte aber nicht paarweise durchgeführte Daten handelt.

Der gepaarte t-test wurde zur Ermittlung der Statistischen Signifikanz bei der Membranpotentialmessung sowie den Aggregometer Versuchen genutzt, da es sich ebenfalls um normalverteilte Daten handelt und diese Versuche stets mit einer Wt und einer KO Probe parallel durchgeführt wurden.

Für die Auswertung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion wurde ein One-Way ANOVA Test (zweiseitig) mit nachgeordnetem Dunn's test verwendet, da hier mehr als 2 Gruppen miteinander verglichen wurden. Alle Daten dieses Versuchs waren normalverteilt und unabhängig voneinander.

Die Unterschiede wurden als statistisch Signifikant erachtet bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ * und als hoch Signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,01$ **.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinanalyse von Thrombozyten auf KCa3.1

Die Analyse der Proteinexpression von KCa3.1 in murinen Thrombozyten mittels Western-Blot zeigt eine schwache aber deutliche und reproduzierbar nachweisbare Expression des KCa3.1 Kanals in Wt-Thrombozyten im Bereich von ~50 kDa. Diese Bande war in Thrombozyten von KCa3.1 KO Mäusen nicht nachweisbar (n=6). Als Positiv-Kontrolle wurden Lysate von Fibroblasten aus Wt-Mäusen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von AG Köhler) verwendet (Abbildung 4.1). Zur Ladekontrolle, die der Überprüfung der Beladung mit gleichen Proteinmengen diente, wurde zusätzlich mit Ponceau S gefärbt.

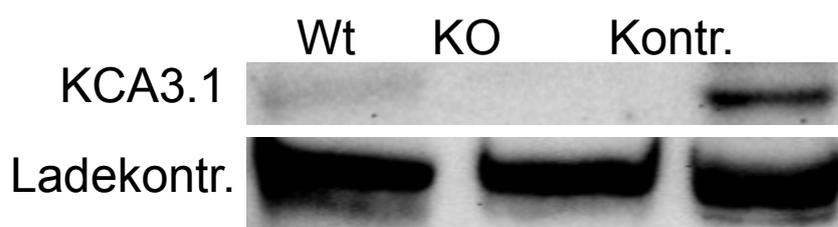


Abbildung 4.1: Western-Blot.

Wt-Thrombozyten exprimieren KCa3.1 während dieses Protein in KCa3.1 KO Thrombozyten fehlt. Als Positiv-Kontrolle wurden Fibrinoblasten aus Wt-Mäusen verwendet. Als Ladekontrolle wurde mit Ponceau S gefärbt.

4.2 Blutbild von Wildtyp und KCa3.1 KO Mäusen

4.2.1 Kleines Blutbild

Im kleinen Blutbild von Wt (n=9) und KCa3.1 KO Mäusen (n=10) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Thrombozyten-Anzahl (1081,9 t/ μ l \pm 100,3 vs 865,9 t/ μ l \pm 45,4), Erythrozyten-Anzahl (10,58 Mio/ μ l \pm 0,3 vs 9,95 Mio/ μ l \pm 0,4), Hämoglobinwert (15,38 g/dl \pm 0,5 vs 16,79 g/dl \pm 0,7), Hämatokrit (50,73 % \pm 1,5 vs 54,24 % \pm 1,5) und mittlerer korpuskulärer Hämoglobinkonzentration (30,29 g/dl \pm 0,3 vs 30,89 g/dl \pm 0,8). Jedoch konnten signifikante Unterschiede in der Leukozyten-Anzahl (7,9 t/ μ l \pm 0,9 vs 13,95 t/ μ l \pm 1,9), der Größe der Erythrozyten (47,96 fl \pm 0,5 vs 54,98 fl \pm 1,5) und der mittleren Hämoglobinkonzentration (14,56 pg \pm 0,2 vs 16,94 pg \pm 0,5) gemessen werden; getestet mit t-test (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Kleines Blutbild von Wt und KCa3.1 KO Thrombozyten.

Thrombozyten (Plt), Weiße Blutzellen (WBZ), Rote Blutzellen (RBZ), Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt), mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) und mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC)

	Plt	WBZ**	RBZ	Hb	Hkt	MCV**	MCH**	MCHC	n
	[t/ μ l]	[t/ μ l]	[Mio/ μ l]	[g/dl]	[%]	[fl]	[pg]	[g/dl]	
Wt	1081,9 \pm 100,3	7,60 \pm 0,9	10,58 \pm 0,3	15,38 \pm 0,5	50,73 \pm 1,5	47,96 \pm 0,5	14,56 \pm 0,2	30,29 \pm 0,3	9
KCa3.1 KO	865,9 \pm 45,4	13,95 \pm 1,9	9,95 \pm 0,4	16,79 \pm 0,7	54,24 \pm 1,5	54,98 \pm 1,5	16,94 \pm 0,5	30,89 \pm 0,8	10

4.2.2 Thrombozyten-Größe

Die im Durchflusszytometer mittels Analyse des mittleren Forwardscatter (Mean FSC) ermittelte relative Größe der Thrombozyten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Wt-Thrombozyten ($2500,96 \text{ RFU} \pm 199,3$, $n=9$) und KCa3.1 KO Thrombozyten ($2431,21 \text{ RFU} \pm 339,2$, $n=8$, t-test) (Abbildung 4.2).

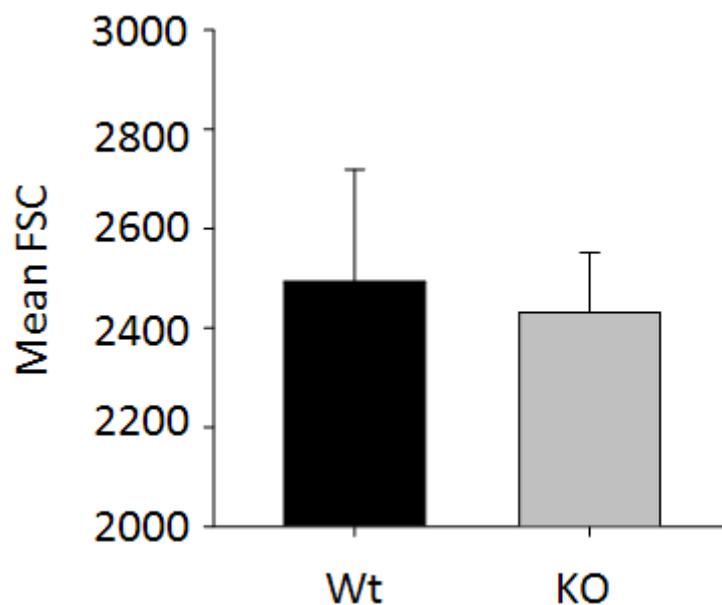


Abbildung 4.2: Indirekte Bestimmung der Thrombozyten-Größe mittels Durchflusszytometrie.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Größe (Mean FSC) von Wt Thrombozyten im Vergleich zu KCa3.1 KO Thrombozyten (t-test, $n=5$)

4.3 Rezeptorexposition auf ruhenden Thrombozyten

Um den Einfluss des KCa3.1 Kanals auf die Rezeptorexposition zu untersuchen, wurden Wt- und KCa3.1 KO Thrombozyten auf ihre Rezeptoren hin untersucht. Durchflusszytometrische Untersuchungen der Exposition der CD61 (IIIa Untereinheit des heterodimeren Integrinrezeptor für Fibrinogen Glykoprotein IIb/IIIa alias $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin alias CD41-CD61) auf der Oberfläche von ruhenden Wt- (4420,81 RFU \pm 91,0; n=9) und KCa3.1 KO-Thrombozyten (4514,13 RFU \pm 155,47; n=8) zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4.3A). Nach Normierung der Anzahl der Rezeptoren (gemessen durch die Fluoreszenzintensität) auf die durchschnittliche Größe der jeweiligen individuellen Thrombozytenpopulation (Abbildung 4.4), zeigt sich jedoch eine signifikant höhere Rezeptordichte von CD61 auf KCa3.1 KO Thrombozyten (2,04 \pm 0,05; n=8) im Vergleich zu Wt-Thrombozyten (1,74 \pm 0,1; n=8, t-test), was ein Hinweis auf die vermehrte durchschnittliche Expression des GPIIb/IIIa Rezeptors auf KCa3.1 KO Thrombozyten darstellt.

Die Exposition von CD62P (P-Selektin) auf ruhenden Wt-Thrombozyten im Vergleich zu KCa3.1 KO Thrombozyten ergab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Rezeptoren (362,2 RFU \pm 21,8 n=9 vs 373,5 RFU \pm 34,5 n=8, Abbildung 4.3B) oder in der Rezeptordichte auf der Oberfläche (0,13 \pm 0,01 vs 0,15 \pm 0,01, n=8, t-test, Abbildung 4.4B).

Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Rezeptoranzahl (Abbildung 4.3C) oder Rezeptordichte (Abbildung 4.4C) von CD42d (Glykoprotein V, Untereinheit des heterotrimeren GP Ib-V-IX, der vWF-Rezeptor auf Thrombozyten) auf Wt-Thrombozyten im Vergleich zu KCa3.1 KO Thrombozyten.

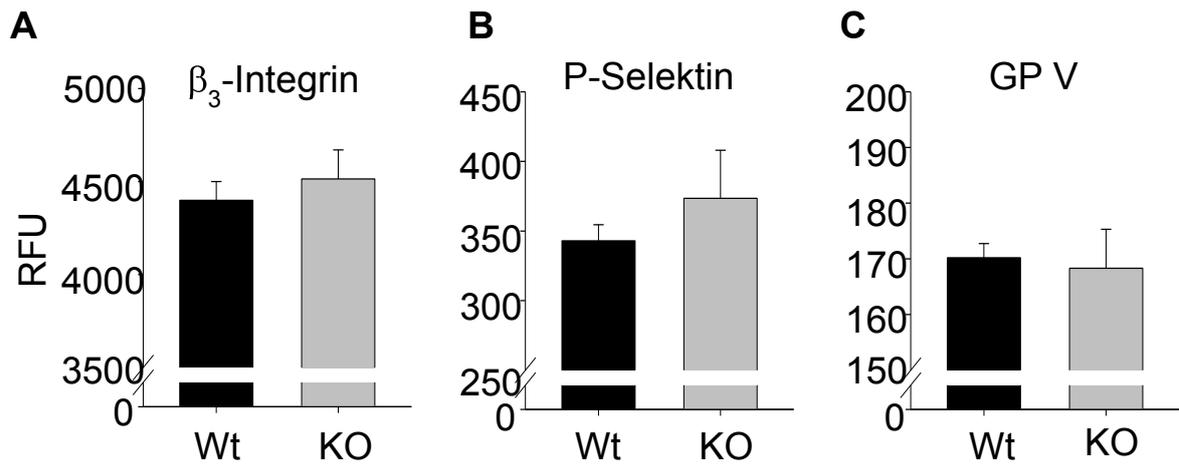


Abbildung 4.3: Relative Fluoreszenz korrelierend zu relativer Anzahl an Rezeptoren auf Wt und KCa3.1 KO Thrombozyten (KO).

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an β_3 -Integrin (CD61), P-Selektin (CD62P) oder Glykoprotein V (GP V, CD42d) festgestellt werden. t-test, n=8

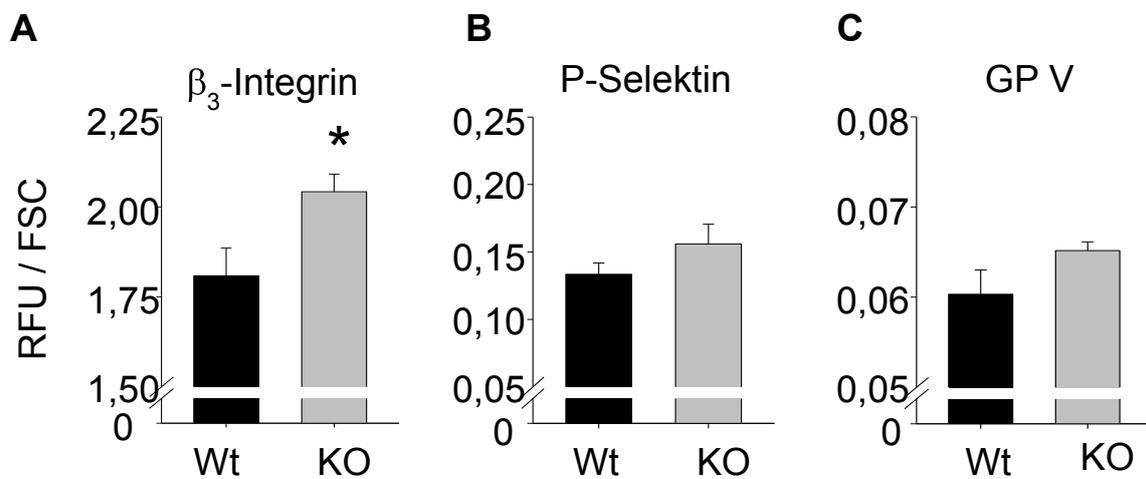


Abbildung 4.4: Relative Fluoreszenz normiert auf die relative Größe der Thrombozyten (RFU/FSC)

zeigen eine signifikant höhere Rezeptordichte an β_3 -Integrin auf KCa3.1 KO Thrombozyten im Vergleich zu Wt-Thrombozyten. Die Rezeptordichte von P-Selektin und Glykoprotein V zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Wt- und KCa3.1 KO Thrombozyten. *P<0,05 t-test, n=8

4.4 Membranpotentialmessung an Maus-Thrombozyten

Das Membranpotential wurde indirekt mittels eines membransensitiven Farbstoffes im Durchflusszytometer beurteilt. Der mittlere Fluoreszenzwert dieses potentialsensitiven Farbstoffes betrug bei Wt-Mäusen $761,5 \text{ RFU} \pm 182,1$. Thrombozyten von KCa3.1 KO Mäusen zeigten im Vergleich dazu signifikant erhöhte Fluoreszenzwerte von $1054,7 \text{ RFU} \pm 257,0$. Nimmt man für Wt-Thrombozyten in Analogie zu humanen Thrombozyten eine intrazelluläre Kaliumkonzentration von 140 mM und ein daraus mittels der Nernst-schen Gleichung errechnetes Ruhepotential von -57 mV an (Krötz et al. 2004), so lässt sich daraus mittels der Valinomycin-Nullpunktmehtode (MacIntyre et al. 1982; Pipili 1985) und einer Standardreihe diverser extrazellulärer Kaliumkonzentrationen für KCa3.1 KO Thrombozyten ein Ruhemembranpotential von $-21,3 \text{ mV} \pm 13,0$ errechnen (Abbildung 4.5).

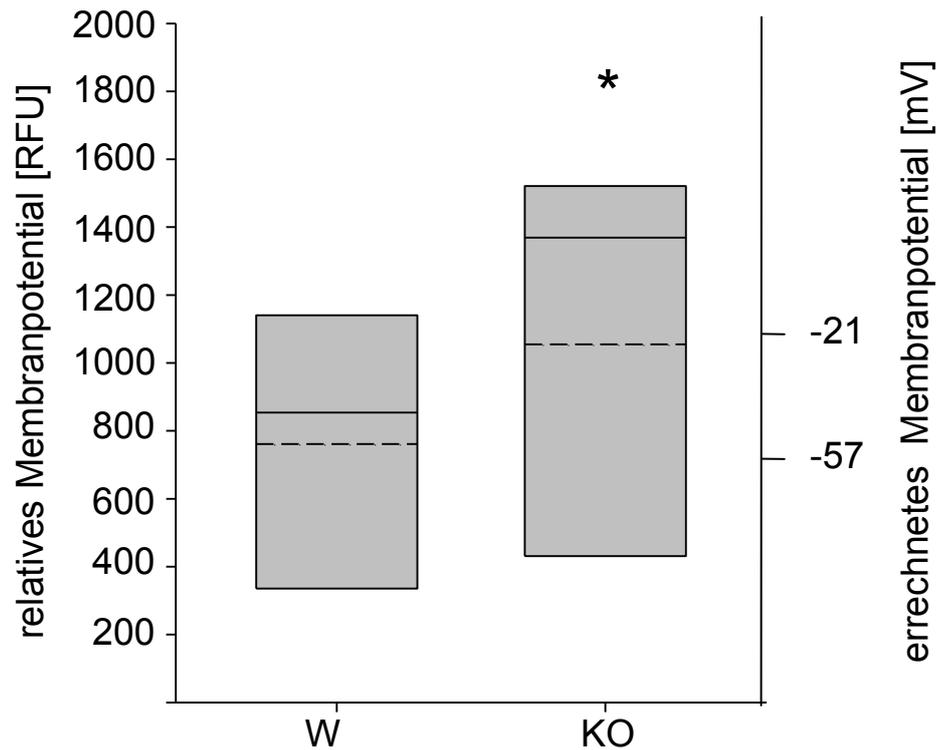


Abbildung 4.5: Fluoreszenzwerte der Durchflusszytometrisch gemessenen Beladung von Thrombozyten

mit dem Membranpotential-sensitiven Farbstoff DiBac (links) und daraus folgernd errechnetes Membranpotential von murinen Wt bzw. KCa3.1 KO Thrombozyten. Die Kalkulation des Membranpotential in mV wurde in Analogie zur Messung mit humanen Thrombozyten vorgenommen . RFU *P<0,05 paired t-test, n=5

4.5 Reversible und irreversible Thrombozytenaktivierung bei Wildtyp und KCa3.1 KO Thrombozyten

Die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit 1 μM ADP war sowohl bei Wt- als auch bei KCa3.1 KO Thrombozyten reversibel (Tabelle 4.2). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wt- und KCa3.1 KO Thrombozyten in der maximalen Aggregation nach 5 min ($46,8\% \pm 6,3$ vs $43,5\% \pm 4,8$, je $n=4$) und der Anstiegssteilheit der Aggregationskurve („Slope“, $58,8 \pm 6,4$ vs $55,8 \pm 9,8$, je $n=4$). Ebenso ließ sich kein signifikanter Unterschied im Verhalten der Wt- ($n=4$) und KCa3.1 KO Thrombozyten ($n=3$) nach Stimulation mit 10 μM ADP feststellen; bei dieser höheren Dosierung zeigten die Thrombozyten beider Gruppen in sämtlichen Versuchen eine irreversible Aggregation mit einem Maximum nach 5 min von $71\% \pm 4,3$ bei Wt-Thrombozyten und $59\% \pm 7,2$ bei KCa3.1 KO Thrombozyten, sowie einem Slope von $75,5 \pm 9,8$ bei Wt-Thrombozyten und $50,7 \pm 18,7$ bei KCa3.1 KO Thrombozyten. Die geringe Anzahl ergab sich hier leider durch fehlenden Nachwuchs der KO Mäuse.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach Stimulation mit 3 μM ADP nach 5min eine in Wt-Thrombozyten signifikant geringere maximale Aggregation im Vergleich zu KCa3.1 KO Thrombozyten ($57,3\% \pm 1,6$ vs $68,1\% \pm 3,1$; Steigung $46,9 \pm 6,5$ vs $63,0 \pm 6,3$) (Abbildung 4.6). Die Aggregation in allen Versuchen mit Wt-Thrombozyten war bei dieser ADP-Konzentration reversibel, wohingegen nur bei einem von 9 Aggregationsversuchen mit KCa3.1 KO Thrombozyten eine reversible Aggregation vorlag und in allen anderen Fällen eine irreversible Aggregation eintrat (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.2: Aggregation mit 3µM ADP

	Aggregation [%]	Steigung	reversibel / irreversibel	n
Wt	57,3 ± 1,6	46,9 ± 6,5	9 / 0	9
KCa3.1 KO	68,10 ± 3,1	63,0 ± 6,3	1 / 8	9

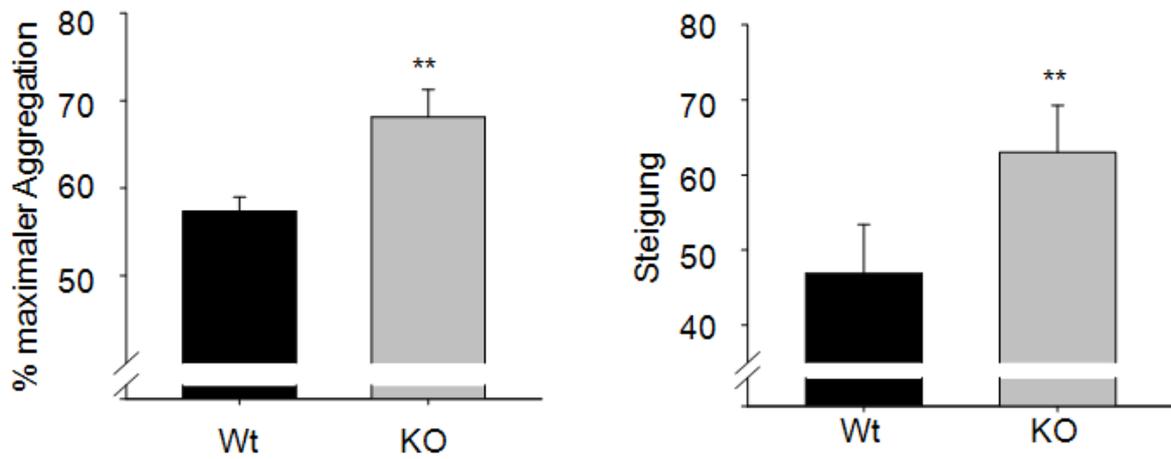


Abbildung 4.6: Maximale Aggregation (links) und Steigung (rechts)

bei Aktivierung mit 3 µM ADP sind bei KCa3.1 KO Thrombozyten (KO) signifikant erhöht im Vergleich zu Wt Thrombozyten **P<0,01 paired t-test n=9

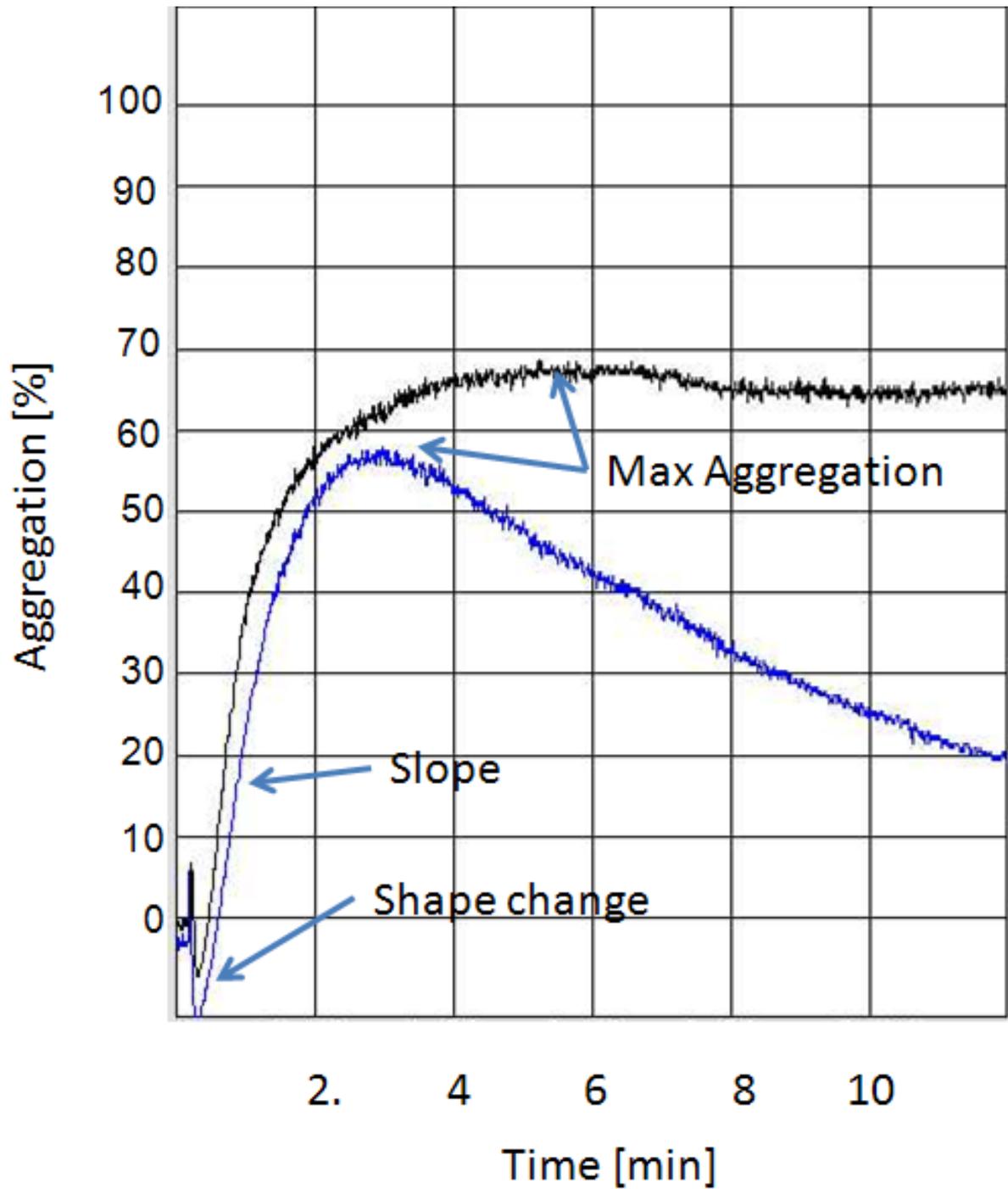


Abbildung 4.7: Beispiel eines Aggregationstraces

von Wt Thrombozyten (blau) und KCa3.1 KO Thrombozyten (schwarz) nach Stimulation mit 3 μ M ADP.

4.6 Thrombozyten-Endothel-Interaktion an KCa3.1 KO Mäusen

Um zu überprüfen, ob die beschleunigte Thrombusbildung nach Gefäßverletzung bei KCa3.1 KO Mäusen auf ein Fehlen des Kanals auf Thrombozyten oder auf dem Endothel zurückzuführen ist, wurde die Thrombozyten-Endothel-Interaktion in der Mikrozirkulation der Rückenhaut in unterschiedlichen Versuchsreihen untersucht (Abbildung 4.8). Hierzu wurden zunächst Wt-Thrombozyten in Wt-Mäuse injiziert (Kontroll-Gruppe), wobei $0,47\% \pm 0,09$ der analysierten Thrombozyten mit der arteriellen Gefäßwand interagierten ($n=5$). Bei Infusion von Wt-Thrombozyten in KCa3.1 KO Mäuse konnte demgegenüber keine signifikant erhöhte Interaktion festgestellt werden ($1,58\% \pm 0,27$ Thrombozyten-Endothel-Interaktion, $n=6$). Nach Injektion von KCa3.1 KO Thrombozyten in Wt-Mäusen kam es jedoch zu einem signifikant erhöhten Anteil von interagierenden Thrombozyten am arteriolären Endothel im Vergleich zur Kontrollgruppe ($5,45\% \pm 1,47$ Thrombozyten-Endothel-Interaktion, $n=5$, $P<0,05$). Der Median bestätigte dieses Geschwindigkeitsmuster. Er lag für die Kontrollgruppe bei $39,3\%$, für KO Mäuse mit Wt-Thrombozyten bei $36,3\%$ und für Wt-Mäuse mit KCa3.1 KO Thrombozyten bei $33,5\%$ der Maximalgeschwindigkeit.

In den Histogrammen ließ sich die Geschwindigkeitsverteilung der gemessenen Thrombozyten erkennen, wobei langsame Thrombozyten im Histogramm links und schnelle Thrombozyten im Histogramm rechts liegen. Die Geschwindigkeitsverteilung wurde in Prozent der Maximalgeschwindigkeit dargestellt.

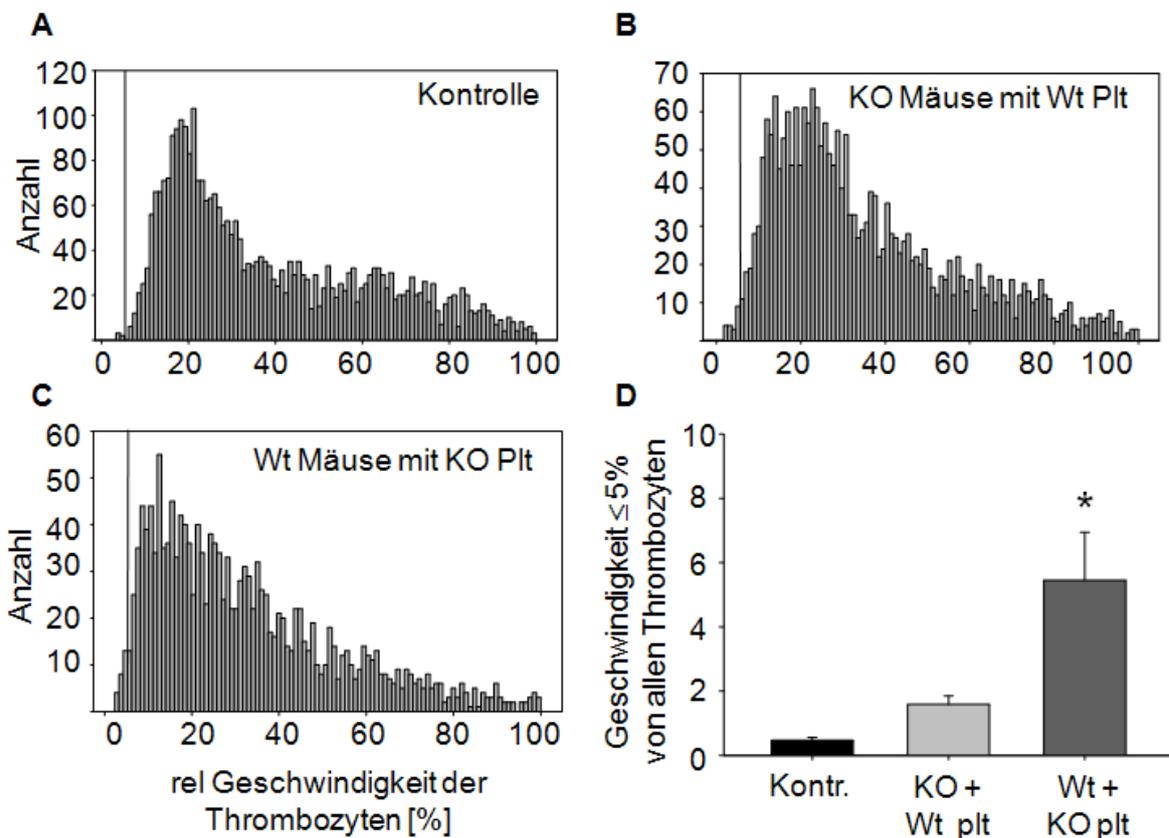


Abbildung 4.8: Geschwindigkeitsverteilung der Thrombozyten-Endothel-Interaktionen

A Verteilung aller analysierten Thrombozyten in Wt-Mäusen nach Injektion von fluoreszenzmarkierten Wt-Thrombozyten (Kontrolle) im Vergleich zu **B** KCa3.1 KO Mäusen nach Injektion von Wt-Thrombozyten und **C** Wt-Mäusen nach Injektion von KCa3.1 KO Thrombozyten. Die x-Achse im Histogramm entspricht der relativen Geschwindigkeit wobei eine erhöhte Thrombozyten-Endothel-Interaktion eine Linksverschiebung im Histogramm bewirkt. **D** Die Anzahl der Thrombozyten innerhalb der Klasse der untersten 5% der Höchstgeschwindigkeit aller analysierten Thrombozyten („Roller“) ist bei KCa3.1 KO Thrombozyten in Wt-Mäusen signifikant höher als in Kontroll Mäusen (Wt-Mäuse mit Wt-Thrombozyten). * $P < 0,05$ One Way Anova, Post-Hoc Analyse nach Dunn's $n=5-6$

4.7 Rolle des KCa3.1 Kanals auf Thrombozyten beim thrombotischen Gefäßverschluss nach experimenteller Gefäßverletzung

Der arterielle Gefäßverschluss durch Thrombusbildung nach exogener Applikation von FeCl₃ wurde zunächst in Arteriolen der Rückenhaut von Wt-Mäusen (Durchmesser 111,5 µm ± 5,9) durchgeführt. Dabei zeigte sich eine durchschnittliche Gefäßverschlusszeit von 320,1 s ± 23,0 (n=9, Anmerkung: bei n=6 Tieren in dieser Versuchsreihe trat nach 360 Sekunden kein Verschluss ein: diese wurden mit 360s gewertet). Im Vergleich hierzu zeigten KCa3.1 KO Mäuse nach exogener FeCl₃ Applikation eine signifikant schnellere Thrombusbildung und damit einhergehend früher auftretende Gefäßverschlüsse innerhalb von 163,4 s ± 50,8 (n=8, P<0,05, Gefäßdurchmesser 99,7 µm ± 5,1; kein Gefäßverschluss innerhalb der 360s bei n=2) (Abbildung 4.9).

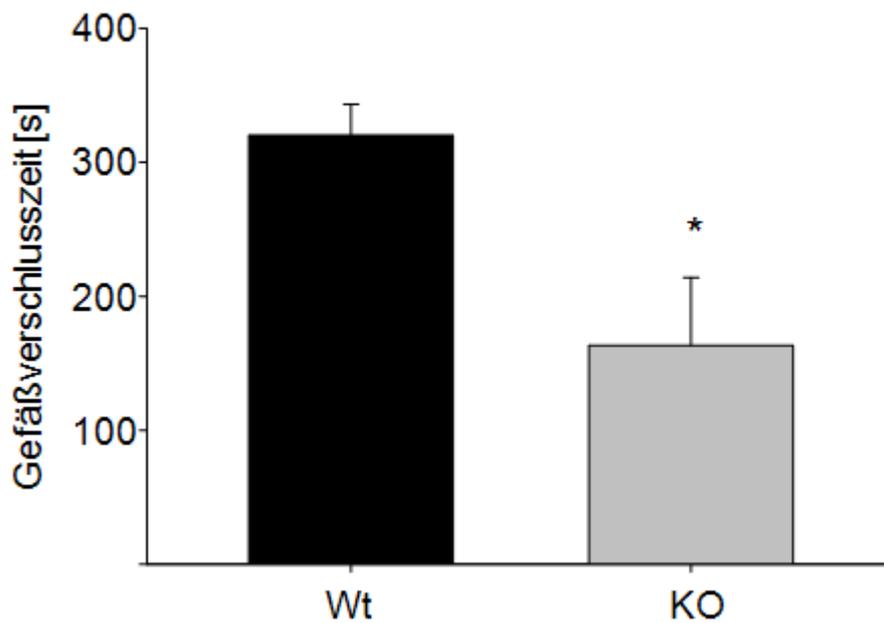


Abbildung 4.9: Die Zeit bis zum Eintreten eines Gefäßverschlusses durch Thrombusbildung nach Gefäßverletzung mit Eisen-(III)-Chlorid ist bei KCa3.1 KO Mäusen (KO) signifikant kürzer als bei Wt-Mäusen (Wt). *P<0,05 t-test n=9

Um den Einfluss der unterschiedlichen Gefäßdurchmesser zu berücksichtigen, wurde im Anschluss an die Gefäßverschlusszeit auf den Gefäßquerschnitt normiert. Die Gefäßverschlusszeit pro μm^2 ist auch hier bei KCa3.1 KO Mäusen signifikant kürzer als bei Wt-Mäusen (Wt $1,84 \text{ s}/\mu\text{m}^2 \pm 0,1$ vs KO $0,95 \text{ s}/\mu\text{m}^2 \pm 0,3$; Abbildung 4.10).

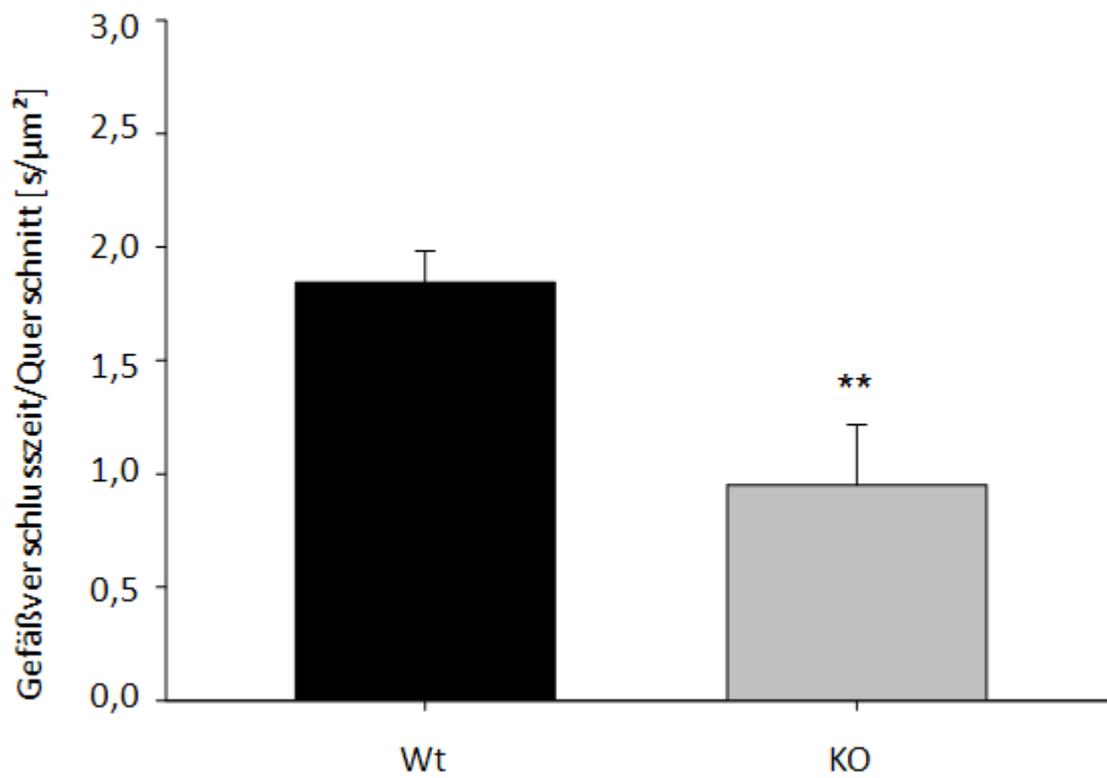


Abbildung 4.10: Die Gefäßverschlusszeit durch Thrombusbildung nach Gefäßverletzung mit Eisen-(III)-Chlorid normiert auf den Gefäßquerschnitt ist bei KCa3.1 KO Mäusen signifikant kürzer als bei Wt-Mäusen. **P<0,01 t-test n=9

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Expression und funktionellen Rolle des Calcium-aktivierten Kalium Kanals intermediärer Leitfähigkeit (KCa3.1) auf Thrombozyten.

Grundlage der Überlegungen waren Vorarbeiten zur Frage der Identifikation von EDHF und dessen Einfluss auf Thrombozyten (Krötz et al. 2004; Feletou et al. 2006; Krötz et al. 2009).

Es werden nach wie vor mehrere verschiedene Substanzen und Kompartimente als Identität von EDHF oder als in der Signalkaskade von EDHF beteiligte Substanzen diskutiert. Darunter befinden sich einerseits Metabolite der Arachidonsäure, wie Epoxeicosatrienoidsäuren (EETs), aber auch Gap Junctions, (Kalium-) Ionen sowie Wasserstoffperoxid und CNP (C-type natriuretic peptide). Um die Hypothese, dass Kaliumkanäle an der durch EDHF ausgelösten Signalkaskade beteiligt sind, besser untersuchen zu können, wurde eine KCa3.1 defiziente Mauslinie (KCa3.1 KO) erschaffen und das EDHF Signal am Endothel dieser KCa3.1 KO Mäuse untersucht (Si et al. 2006). Untersuchungen an Thrombozyten hatten bereits gezeigt, dass EDHF sowie EETs Einfluss auf Thrombozyten haben (Krötz et al. 2004; Krötz et al. 2009). Weiterhin konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass KCa Kanäle an der durch EDHF bzw EETs getriggerten Signalkaskade beteiligt sind. Welcher KCa Kanal dabei eine Rolle spielen könnte und in wieweit dies Auswirkung auf die Funktion der Thrombozyten in vitro sowie in vivo haben würde, war zu Beginn dieser Arbeit jedoch noch unklar.

5.1 Phänotyp KCa3.1-difizienter Mäuse

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass KCa3.1 KO Mäuse bereits in Ruhe einen signifikant erhöhten Blutdruck im Vergleich zu Wt-Mäusen aufweisen. Dies ließ sich dadurch erklären, dass in glatten Gefäßmuskelzellen, aber auch in Endothelzellen von KCa3.1 KO Mäusen nach Acetylcholingabe eine verminderte Hyperpolarisation und damit eine verminderte Vasodilatation im Vergleich zu Wt-Mäusen auftrat, welche durch die Anwesenheit von KCa2.3 Kanälen nicht kompensiert werden konnte (Si et al. 2006). Durch die resultierende stärkere Vasokonstriktion im Gefäßbett kam es zum Anstieg des arteriellen Blutdruckes. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass KCa3.1 KO Mäuse eine Splenomegalie aufweisen und dass deren Erythrozyten vergrößert sind (Makrozytose) (Grgic et al. 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten folgende hämatologischen Anomalien festgestellt bzw. bestätigt werden: Im kleinen Blutbild ließen sich signifikante Unterschiede in der Anzahl der Leukozyten, dem mittleren korpuskulären Volumen (MCV) und dem mittleren korpuskulären Hämoglobin (MCH) im Vergleich zu Wt-Mäusen feststellen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Thrombozytenanzahl zwischen Wt- und KCa3.1 KO Mäusen gefunden werden und die zusätzliche Untersuchung der Größe der Thrombozyten ergab lediglich eine nicht signifikante Tendenz zu leicht vergrößerten Thrombozyten bei KCa3.1 KO Mäusen im Vergleich zu Wt-Mäusen. Der Nachweis der Expression des KCa3.1 Kanals auf murinen Thrombozyten, und damit die Grundlage für die hier vorgestellten weiteren Untersuchungen, wurde mittels Westernblot bestätigt.

Darüber hinausgehend hat in KCa 3.1 KO Mäusen bislang keine spezifische Charakterisierung eines pathophysiologischen Phänotyps stattgefunden. Offensichtliche Defizite in Mortalität

und Morbidität sind nicht evident. Diese hier vorgelegte Arbeit beschäftigt sich erstmals mit der durch Thrombozyten verursachten Pathophysiologie.

5.2 KCa3.1 KO Thrombozyten zeigen ein schnelleres Erreichen der Aktivierungsschwelle in vitro

Der Einfluss des KCa3.1 Kanals auf die Physiologie der Thrombozyten wurde im Zuge der vorgelegten Arbeit sowohl *in vitro* als auch in einem Mausmodell *in vivo* untersucht.

Die Aktivierung der Thrombozyten wird maßgeblich gesteuert durch Rezeptor-Liganden Interaktionen und daraus folgender Granula-Entleerung während Ihrer Adhäsion an der Gefäßwand bzw. ihrer Aggregation. Dabei ist besonders das cytosolische Calcium an den Signalkaskaden zur Formveränderung, Rezeptor-Exposition und Granula-Entleerung beteiligt.

Der Rolle des Membranpotentials in nicht-erregbaren Zellen oder Zellpartikeln wie es Thrombozyten sind, wird dabei geringe Aufmerksamkeit gewidmet. Dennoch konnte bereits vor vielen Jahren gezeigt werden, dass Thrombozyten, deren MP in Ruhe bei ca. -60 bis -70 mV liegt (MacIntyre et al. 1982; Pipili 1985), während ihrer Aktivierung eine Membrandepolarisation erfahren, wobei unklar blieb, ob dieser Aktivierungs-assoziierten Änderung des MP eine Bedeutung für die Thrombozytenfunktion zukommt. In vorangegangene Untersuchungen mit einem ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Membranpotential-sensitiven Farbstoff DiBac₄ konnte ein Ruhe-Membranpotential von -57 ± 9 mV bei gewaschenen, isolierten humanen Thrombozyten in Suspension ermittelt werden (Krötz et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal durch durchflusszytometrische Abschätzung des murinen thrombozytären Membranpotentials in Wt- und KCa3.1 KO Thrombozyten gezeigt werden, dass tatsächlich ein erhöhtes und damit vergleichsweise depolarisiertes Ruhemembranpotential in KCa3.1 KO Thrombozyten im Vergleich zu den Wt-Thrombozyten vorliegt. Da den KCa3.1 KO Thrombozyten der KCa3.1 Kanal fehlt, kann angenommen werden, dass das verschobene Membranpotential durch einen verminderten Kalium-Ausstrom stattfindet, welcher offensichtlich nicht bzw. nicht vollständig durch andere Kaliumkanäle kompensiert werden kann. Der verminderte Kalium-Ausstrom führt zu einer verminderten Hyperpolarisation. Genauere Ergebnisse ließen sich hier evtl. mittels Patch-Clamp erbringen. Der Nachteil der Patch-Clamp Methode in Bezug auf Thrombozyten ist allerdings die unabdingbare vorangehende Immobilisierung der Thrombozyten. Da Adhäsion für Thrombozyten ein Stimulus zur Aktivierung darstellt, lassen sich ruhende Thrombozyten mit natürlicher Ionenumgebung bislang kaum untersuchen. Außerdem sind murine Thrombozyten durch ihre geringe Größe von nur 1-2µm generell extrem schwer mittel Patch-Clamp Technik zu untersuchen. Die Anwendung eines Membranpotential-sensitiven Farbstoffs bot hier die Möglichkeit die Zellen in Suspension zu untersuchen, was ihrem natürlichen Zustand in Ruhe am nächsten kommt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur funktionellen Bedeutung dieser thrombozytären Membranpotentialänderungen muss am ehesten davon ausgegangen werden, dass das MP in Thrombozyten eine Rolle für das Erreichen einer Aktivierungsschwelle darstellt. Das MP in KCa3.1 KO Mäusen ist in Richtung Depolarisation verschoben. Es konnten jedoch keine Anzeichen spontaner Aggregation *in vivo* gefunden werden, so dass die Thrombozyten in den KO-Mäusen in ruhendem Zustand vorliegen. Ähnliche Charakteristika zeigten sich bereits bei Mäusen mit Defizit der NO-Synthase oder der zyklischen Guanosin-

Monophosphat Kinase in Thrombozyten (Massberg et al. 1999). Obwohl beide Enzyme Teil eines Thrombozyten-hemmenden Signalsystems sind, führen diese Defizite dennoch nicht zu Spontanthrombosen. Allerdings zeigten sich hier wie auch in den in dieser Arbeit verwendeten KCa3.1 KO Mäusen vermehrt Thrombozyten-Endothel-Interaktionen, was die hohe Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion zur Untersuchung der Thrombozytenaktivierung in vivo untermauert. Die Thrombozyten scheinen durch das verschobene MP leichter auf andere Stimuli zu reagieren, als es in Wt-Thrombozyten der Fall ist, ihre Aktivierungsschwelle ist also gesenkt.

Um zu beurteilen, welche Parameter unter den Bedingungen des geänderten MP ebenfalls verändert sind und damit eine Adhäsion oder Aggregation begünstigen könnten, wurde unter anderem die Rezeptorexposition auf der Thrombozytenoberfläche untersucht.

Ein bedeutsamer mechanischer und der zahlenmäßig am stärksten von Thrombozyten exprimierte Rezeptor ist der integrinische Fibrinogenrezeptor (alias Glykoprotein (GP) IIb/IIIa alias $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin alias CD61/CD41), welcher bereits in Ruhe ca. 60.000 mal auf der Oberfläche exprimiert ist und bei Aktivierung der Thrombozyten auf etwa 100.000 Rezeptoren/Thrombozyt hochreguliert wird (Gawaz 1999). Über Fibrinogen, welches mehrere Bindungsstellen für den GP IIb/IIIa Rezeptor aufweist, erfolgt nach Aktivierung der Blutstillung (primäre Hämostase) die Vernetzung der Thrombozyten und dadurch die Bildung eines Thrombozytenaggregats, aus dem schließlich unter anderem durch thrombinvermittelte Fibrinogenspaltung (sekundäre Hämostase) die Thrombusbildung erfolgt. Der Rezeptor besteht, wie alle Integrine, aus zwei heterodimeren Proteinkomponenten, dem α_{IIb} und dem β_3 Integrin.

Ein weiterer für die Adhäsion von Thrombozyten wichtiger Rezeptor ist P-Selektin (CD62P). Er bindet über PSGL-1 oder GP Ib an Endothelzellen oder ebenfalls über PSGL-1 an Monozyten und vermittelt das Anheften (Adhäsion) an diese Zellen (van Gils et al. 2009). Auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten ist er kaum vorhanden und wird nach Aktivierung der Thrombozyten an der Oberfläche präsentiert. Obwohl P-Selektin auf Thrombozyten bei geschädigtem Endothel nach Ischämie keine Rolle zu spielen scheint (Massberg et al. 1998), kann nicht ausgeschlossen werden, dass veränderte (voraktivierte) Thrombozyten durch thrombozytäres P-Selektin vermehrt Interaktionen eingehen.

Ein dritter hier untersuchter Rezeptor ist der GP Ib-V-IX alias CD42a-b-c. Er spielt eine zentrale Rolle bei der primären Hämostase, da seine Hauptaufgabe die Adhäsion der Thrombozyten an vWF ist (Varga-Szabo et al. 2008). Der GP Ib-V-IX-Komplex wird im Gegensatz zu den vorher genannten Rezeptoren nach Aktivierung der Thrombozyten von der Oberfläche entfernt, also herunter reguliert.

In unseren Untersuchungen konnte sich zunächst kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression der oben beschriebenen Rezeptorkomponenten darstellen lassen. Allerdings zeigte sich, dass nach Normierung auf die durchschnittliche Größe der Thrombozyten eine vermehrte Expression des Fibrinogenrezeptors besteht, was eine vermehrte Tendenz zu Aggregation (z.B. auf ADP) erklärt. Da der ebenfalls CD61 enthaltende Vitronektinrezeptor nur in vernachlässigbarer Menge auf Thrombozyten vorhanden ist, kann man bei der Messung des β_3 -Integrins davon ausgehen, dass hier maßgeblich der Fibrinogenrezeptor detektiert wurde.

Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass KCa3.1 KO Thrombozyten bereits bei geringeren ADP-Dosen als Wt-Thrombozyten irreversibel aktiviert werden. Der Schwellenwert zur Aktivierung durch ADP ist bei KCa3.1 KO Thrombozyten demnach schneller erreicht. ADP

wird natürlicherweise von Thrombozyten ausgeschüttet und ist Teil des Verstärkungsmechanismus der Aggregation. Dabei bindet ADP am Thrombozyten an die Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂, welche in der weiteren Signalkaskade die Ca²⁺ Mobilisierung, die Formveränderung und die cAMP Erniedrigung bewirken (Cattaneo 2007). Damit wirkt ADP auf grundlegende Teile der Aggregation der Thrombozyten ein. Thienopyridine, wie Clopidogrel, sind Antagonisten des P2Y₁₂ Rezeptors und werden in der klinischen Behandlung gegen Thrombosebildung besonders nach Stent-Implantierung angewendet (Dorsam et al. 2003). Als wichtiger Bestandteil der Thrombozytenaggregation und klinischen Behandlungen war ADP als Substanz zur Untersuchung der Aggregation von Wt- und KCa3.1 KO Thrombozyten daher besonders interessant.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Dosierung von 3 µM ADP KCa3.1 KO Thrombozyten bereits irreversibel und Wt-Thrombozyten noch reversibel aggregieren. Geringere ADP-Dosen von 1 µM zeigten reversible, gleichstarke Aggregation bei gleichstarker Steigung sowohl bei Wt-Thrombozyten als auch bei KCa3.1 KO Thrombozyten. Hohe ADP-Dosen von 10 µM zeigten eine gleichstarke irreversible Aggregation sowohl bei Wt- als auch bei KCa3.1 KO Thrombozyten. Wird die Aktivierungsschwelle überschritten, ist die Stärke der Reaktion bei Wt- und KCa3.1 KO Thrombozyten gleich. Zwischen diesen zwei ADP-Dosen gibt es allerdings einen Bereich, bei dem KCa3.1 KO Thrombozyten bereits irreversibel aktiviert werden, Wt-Thrombozyten aber nur reversibel aktiviert werden. Ebenso war die maximale Aggregation nach 5 min sowie die Steigung bei KCa3.1 KO Thrombozyten stärker.

Diese leichtere Aktivierbarkeit lässt sich möglicherweise als ein schnelleres Erreichen der Aktivierungsschwelle auf Grund des erhöhten Membranpotentials erklären.

5.3 Ausschaltung der KCa3.1 Kanäle führt zu erhöhter Thrombozyten-Aktivität in vivo

5.3.1 Potentielle Mechanismen einer verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion mit KO Thrombozyten

Im verletzten Endothel binden die Thrombozyten maßgeblich an vWF, wodurch im Thrombozyt Ca^{2+} mobilisiert wird und es zum Shape Change kommt. Im Blutstrom in gesunden Kontrolltieren (Wt-Mäuse mit Wt-Thrombozyten) dagegen kommt es nahezu nie zu relevanten Bindungen zwischen Thrombozyten und dem Endothel, welche den Fluss der Thrombozyten verlangsamen (Buerkle et al. 2004; McClelland et al. 2009; Struthmann et al. 2009). Diese transienten Bindungen können reversibel sein oder der erste Schritt zur stabilen Adhäsion und anschließender Thrombusbildung. Im intakten Gefäß werden vom Endothel anti-thrombotische Substanzen, wie NO und PGI_2 , freigesetzt, welche die Thrombozyten inhibieren. Fehlen diese Substanzen oder sind reduziert, kann vermehrte Thrombozyten-Endothel-Interaktion und Thrombusbildung beobachtet werden. Dies gilt ebenso bei Inhibition einer der in die Signalkaskaden involvierten anderen Faktoren (wie Rezeptoren, Enzyme, Kanäle, etc.) z.B. durch Medikamente oder genetische Veränderungen (Moncada et al. 1976b; Busse et al. 1987; Buerkle et al. 2004; Krötz et al. 2005; Borgdorff et al. 2006; Gambaryan et al. 2008; Struthmann et al. 2009). Dies lässt sich mit einer veränderten Aktivierungsschwelle der Thrombozyten erklären. Dasselbe Bild ergibt sich hier bei den KCa3.1 KO Thrombozyten, da hier ein Teil der im Thrombozyten vorhandenen Regulierungsmechanismen (der KCa3.1 Kanal) fehlt.

Zur Untersuchung der Rolle des KCa3.1 Kanals in Thrombozyten in vivo wurden Thrombozyten sowohl aus Wt als auch aus KO Mäusen isoliert, gefärbt und anschließend

allogen jeweils in eine Maus der genetisch anderen Gruppe injiziert. Die Thrombozyten-Endothel-Interaktion war in diesen Versuchen nur dann signifikant höher, wenn KCa3.1 KO Thrombozyten in Wt-Mäusen injiziert wurden (Abbildung 4.8). Zwar zeigte sich auch eine leichte Tendenz zu erhöhter Thrombozyten-Endothel-Interaktion von Wt-Thrombozyten am KCa3.1 KO Endothel, diese war allerdings nicht signifikant. Damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine erhöhte Thrombozyten-Endothel-Interaktion maßgeblich durch den KCa3.1 KO an Thrombozyten ausgelöst wird und nicht durch den KCa3.1 KO am Endothel.

Das signifikant erhöhte Membranpotential in KCa3.1 KO Thrombozyten bestätigt die Hypothese einer Verschiebung der Aktivierungsschwelle, was sich letztlich in der erhöhten Thrombozyten-Endothel-Interaktion widerspiegelt.

5.3.2 Erhöhtes Risiko zur Thrombusbildung in KCa3.1 KO Mäusen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des KCa3.1 Kanals zu einer verstärkten Thrombusbildung nach Gefäßverletzung führt. In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die KCa3.1 Kanäle in Endothelzellen zur Hyperpolarisation beitragen, welche zu einer Relaxation der Gefäße führt. Das Fehlen der KCa3.1 Kanäle in KO Mäusen führt zu Hypertonie durch verminderte endothelabhängige Vasodilatation (Si et al. 2006). Die schnellere Gefäßverschlusszeit durch Thrombusbildung nach Gefäßverletzung bei KCa3.1 KO Mäusen ließe sich daher zunächst auch durch die geringere Gefäßquerschnittsfläche erklären. Zu diesem Zwecke wurden in unseren Untersuchungen auf die Gefäßquerschnittsfläche normierte Gefäßverschlusszeiten berechnet, welche das Ergebnis des schnelleren Gefäßverschluss bei KCa3.1 KO Mäusen

bestätigen. Die Tatsache, dass die Thrombusbildung bei KCa3.1 KO Mäusen signifikant schneller abläuft als bei Wt-Mäusen muss also mit Komponenten des Blutstromes zusammenhängen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, aggregieren KCa3.1 KO Thrombozyten auch ex vivo, also in einer Situation, in der keine Beeinflussung durch die Gefäßwand mehr vorliegen kann, stärker auf mittlere ADP-Dosen als Wt-Thrombozyten. Vor allem aber erreichen sie schon bei geringeren ADP-Dosen eine irreversible Aggregation als Wt-Thrombozyten. Im Blutstrom ist es normal, dass stetig eine latente Adhäsion und unterschwellige Thrombozytenaktivierung stattfindet. Löst diese latente Stimulation aber eine irreversible Aggregation aus, kann es zur Okklusion und damit zu thrombotischen Komplikationen, wie einem Infarkt kommen. Eine Überschreitung der Schwelle zu irreversibler Aggregation und Okklusion ist im gesunden Gefäßsystem daher unerwünscht.

Die bei KCa3.1 KO Thrombozyten beobachtete erhöhte Oberflächendichte des GP IIb/IIIa, könnte ebenso durch eine veränderte Aktivierungsschwelle auf Grund des Fehlens eines Teils der zur Inhibition gehörenden Signalkaskade verursacht worden sein. Der GP IIb/IIIa Rezeptor wird im gesunden Wt-Thrombozyten nach Endothel-Adhäsion hochreguliert um die Aggregation mit weiteren rekrutierten Thrombozyten zu ermöglichen. Das Fehlen des KCa3.1 Kanals hat in den Thrombozyten zu einer signifikanten Erhöhung dieses Rezeptors geführt, was mit der Beobachtung der leichteren Aggregation durch ADP und einer verschobenen Aktivierungsschwelle vereinbar wäre.

Das Fehlen des Kanals und des damit verbundenen Kalium-Stromes führt demnach zu einer prothrombotischen Neigung. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die schnellere Thrombusbildung bei KCa3.1 defizienten Tieren primär durch Thrombozyten, die aufgrund einer Defizienz von KCa3.1 leichter aktivierbar sind, ausgelöst wird. Die dazu beitragenden

hier gemessen Effekte sind letztlich alle durch eine Veränderung des Kaliumstromes verursacht.

5.4 Limitationen und Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte erstmals die Wichtigkeit des KCa3.1 Kanals auf Thrombozyten durch eine Veränderung des Membranpotentials und der Aggregation bei Fehlen des KCa3.1 Kanals in vitro nachgewiesen werden.

Die erhöhte Thrombozyten-Endothel-Interaktion in KCa3.1. defizienten Mäusen in vivo lässt auf ein erhöhtes arterielles Thromboserisiko schließen. Die verstärkte Thrombusbildung bei Gefäßverletzung unterstützt diese Schlussfolgerung. Damit zeigt die vorliegende Arbeit, dass der KCa3.1 Kanal auf Thrombozyten bedeutsam zur Regulation der Hemmung der Thrombozytenaktivierung, zumindest im murinen System beiträgt.

Auf diese Weise ist ein wichtiger Baustein in der komplexen Regulation der Thrombozyten gefunden. Diese Erkenntnisse tragen maßgeblich zum Verständnis der Pathophysiologie thrombotischer Krankheitsbilder bei. Eine solche Schwelle kann bei instabiler Angina pectoris darüber entscheiden, ob es bereits zu einer irreversiblen Thrombusbildung und Okklusion und damit zum Infarkt kommt oder nicht. Der KCa3.1 Kanal könnte damit auch im Menschen ein Teilstück in einem komplexen Balancespiel zwischen Ruhe, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten darstellen, zu dem auch Substanzen wie NO oder PGI₂ als auch TxA₂ oder ADP beitragen. Jede einzelne Substanz allein entscheidet in vivo nicht über Blutfluss oder Okklusion, aber jede trägt einen Anteil dazu bei, Thrombozyten näher hin oder weiter weg

von dem Punkt der reversiblen bzw. irreversiblen Aggregation zu verschieben. In welchem Bereich innerhalb des Ruhezustands sich die Thrombozyten befinden, kann über Infarkt oder kein Infarkt und somit auch über Leben oder Tod entscheiden.

Diese in dieser Arbeit am Mausmodell erlangten Daten sind ein Hinweis auf eine mögliche physiologische Wirkweise an humanen Thrombozyten und passen zu den mit pharmakologischen Hemmstoffen erlangten Daten an humanen Thrombozyten. Diese Arbeit schließt damit eine weitere Lücke zum Verständnis des physiologischen Verhaltens von Thrombozyten.

6 Zusammenfassung

Der Kalzium-abhängige Kaliumkanal 3.1 (KCa3.1) ist an der EDHF-Antwort an Endothelzellen beteiligt. Weitere Arbeiten zeigten bereits, dass ein KCa Kanal mit intermediärer Leitfähigkeit auch auf humanen Thrombozyten vorhanden ist. Jedoch ist unklar, in wieweit die KCA Kanäle auf die Aktivität der Thrombozyten Einfluss haben.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Kalzium-abhängigen Kaliumkanals 3.1 (KCa3.1) auf Thrombozyten untersucht. Hierzu wurden murine Thrombozyten aus Wildtyp und KCa3.1 KO Mäusen auf deren Funktion in vitro und in vivo untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass humane und murine Thrombozyten den KCa3.1 Kanal exprimieren und ein Defizit dieses Kanals das Membranpotential bei ruhenden murinen Thrombozyten erhöht. Im kleinen Blutbild oder bei der Größe der KCa3.1 KO Thrombozyten konnte keine Veränderung festgestellt werden. Jedoch zeigen KCa3.1 KO Thrombozyten eine signifikante Steigerung der β_3 -Integrin Dichte, aber keine signifikante Veränderung in Anzahl oder Dichte der P-Selektin oder der Glykoprotein V Rezeptoren. Das erhöhte Membranpotential und die höhere Dichte an β_3 -Integrin auf ruhenden Thrombozyten in vitro lässt auf eine höhere Aktivität der KCa3.1 KO Thrombozyten schließen.

KCa3.1 KO Thrombozyten reagieren bei niedrigeren Stimuli mit irreversibler Aggregation als es Wt-Thrombozyten tun. In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied bei 3 μ M ADP Stimulation beobachtet werden – Wt-Thrombozyten aggregieren hier reversibel, wohingegen KCa3.1 KO Thrombozyten bereits irreversibel aggregieren. Ebenso ist die Aggregationsstärke sowie die Steigung mit einer Stimulation von 3 μ M ADP bei KCa3.1 KO

Thrombozyten signifikant höher als bei Wt-Thrombozyten. Diese Ergebnisse bestätigen eine erhöhte Aktivität in KCa3.1 KO Thrombozyten im Vergleich zu Wt-Thrombozyten.

Um den Einfluss dieser Veränderungen und damit die Wichtigkeit des Kanals *in vivo* zu beurteilen, wurde die Thrombozyten-Endothel-Interaktion an Kontrolltieren (Wt Mäuse mit Wt-Thrombozyten), an Wt-Mäusen mit KCa3.1 KO Thrombozyten und an KCa3.1 KO Mäusen mit Wt-Thrombozyten untersucht. Es zeigte sich, dass der KCa3.1 KO an Thrombozyten, nicht aber am Endothel, die Thrombozyten-Endothel-Interaktion signifikant erhöht.

Zudem zeigten KCa3.1 KO Mäuse einen signifikant schnelleren thrombotischen Gefäßverschluss nach Endothelzerstörung durch Eisen-(III)-Chlorid Applikation als Wt-Mäuse.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der KCa3.1 Kanal auf Thrombozyten wichtig für die Verhinderung der Thrombozytenaktivierung ist und durch seine Existenz und Funktion einer übermäßigen Aktivierung von Thrombozyten entgegenwirkt. Die Hemmung von Thrombozyten spielt im gesunden Gefäß eine große Rolle, da hier nicht nur ungewollte Thrombusbildung und damit Thrombosen entgegengewirkt wird, sondern auch weil aktivierte Thrombozyten zur Atherosklerosebildung beitragen. Derartige neue Erkenntnisse können dabei helfen, neue Therapieansätze für eine Vielzahl an kardiovaskulären Krankheiten zu finden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten.....	2
Abbildung 1.2: Thrombozyten-Aktivierung in vivo	4
Abbildung 1.3: Thrombozyten-vermittelter Gefäßverschluss nach rupturiertem Plaque (Bilder wurden erstellt mit Servier Medical Art, www.servier.com).....	7
Abbildung 1.4: Endogene Hemmung der Thrombozyten durch Prostacyclin (PGI ₂) und Stickstoffmonoxid (NO).....	9
Abbildung 3.1: Rückenhautkammermodell	31
Abbildung 3.2: Intravitalmikroskop.....	34
Abbildung 4.1: Western-Blot.....	39
Abbildung 4.2: Indirekte Bestimmung der Thrombozyten-Größe mittels Durchflusszytometrie.....	41
Abbildung 4.3: Relative Fluoreszenz korrelierend zu relativer Anzahl an Rezeptoren auf Wt und KCa3.1 KO Thrombozyten (KO).....	43
Abbildung 4.4: Relative Fluoreszenz normiert auf die relative Größe der Thrombozyten (RFU/FSC).....	43
Abbildung 4.5: Fluoreszenzwerte der Durchflusszytometrisch gemessenen Beladung von Thrombozyten	45
Abbildung 4.6: Maximale Aggregation (links) und Steigung (rechts).....	47
Abbildung 4.7: Beispiel eines Aggregationstraces	48
Abbildung 4.8: Geschwindigkeitsverteilung der Thrombozyten-Endothel-Interaktionen	50
Abbildung 4.9: Die Zeit bis zum Eintreten eines Gefäßverschlusses	52
Abbildung 4.10: Die Gefäßverschlusszeit durch Thrombusbildung.....	53

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Kleines Blutbild von Wt und KCa3.1 KO Thrombozyten.....	40
Tabelle 4.2: Aggregation mit 3 μ M ADP.....	47

9 Abkürzungen

Abkürzung / Symbol	Bedeutung
λ	Lambda = Wellenlänge
2PK	2 Poren Kaliumkanäle
A.	Arteria = Arterie
A.dest	Aqua (Wasser) destilliert
AC	Adenylat-Cyclase (Zyklase)
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
AG	Aktiengesellschaft
AG & Co.KG	Aktiengesellschaft und Compagnie Kommanditgesellschaft
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BCA	bichinonic acid
BKCa, KCa1.1	Big KCa
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cAMP	Cyclic Adenosin Mono Phosphat
CCD	Charge Coupled Device = Fotosensor
CD	Cluster of differentiation
CDxxL	Ligand für CDxx Rezeptoren
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
cGMP	Cyclic Guanosin-Mono-Phosphat

CNP	C-type natriuretic peptide
Cu ²⁺	2-wertige Kupfer-Ionen
Cu ¹⁺	1-wertige Kupfer-Ionen
CYP2C9	CytP450 2C9
CytP450	Cytochrom P450 Monooxygenase
D-Glucose	Dexter-Glucose (rechtsdrehend)
DAG	Diacylglycerine
DiBAC ₄ (3),	Bis- [1,3-dibutylbarbituric acid] trimethine oxonol
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
EDHF	Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EET	Epoxy-eicosatrienoische Säure
engl.	englisch
et al.	und andere
Etc.	Et cetera
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell sorting = Durchflusszytometer
FeCl ₃	Eisen-(III)-Chlorid
GC	Guanylat-Zyklase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co.KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft
GP	Glykoprotein
H ₂ O	Dihydrogeniumoxid = Wasser

Hb	Hämoglobin
HCl	Wasserstoffchlorid = Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hkt	Hämatokrit
HUVEC	humane Umbilical-venösen Endothelzellen
ID	Inner diameter = Innendurchmesser
IKCa, KCa3.1	intermediate KCa
inkl.	inklusive
IP3	Inositol-Tri-Phosphat
IP3R	Inositol-Tri-Phosphat-Rezeptor
K-Kanäle	Kalzium-Kanäle
K ⁺	Kalzium-Ion
KCa	Kalzium-abhängiger Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
Kir	einwärts-gerichtete Kaliumkanäle
KO	Knock-Out
Kontr.	Kontrolle
Kv	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M.	Musculus = Muskel
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n (Symbol)	Anzahl an Versuchen
N-terminal	Deklaration der Proteinbindungs-Orientierung.
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat

NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Outer diameter = Außendurchmesser
P (Symbol)	Propability = Wahrscheinlichkeit
P2X ₁	Liganden gesteuerte Ionen-Kanäle
P2Y ₁₂ Rezeptoren	Purinerge, G-protein gekoppelte Rezeptoren
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PBS	Phosphate-buffered-saline, phosphatgepufferte Saline
PF4	Plättchen Faktor 4
PFA	Paraformaldehyd
PGI ₂	Prostacyclin
pH	pH-Wert
Plt / plt	platelets = Thrombozyten
Prof.	Professor
PRP	Plättchenreiches Plasma
RBZ	Rote Blutzellen
Ref.	Referenz
Rel.	relative
Roller	Endothel interagierende Thrombozyten
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	„Système international d’unités“ = Internationales Einheitensystem
SKCa, KCa _{2.3}	small KCa
t (Symbol)	Anzahl in Tausend

TP-Prostanoidrezeptoren	
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC6	Transient receptor potential channel, subfamiliy C, member 6
TxA ₂	Thromboxan A ₂
v.l.n.r.	Von links nach rechts
vs	versus
vWF	von Willebrandt Faktor
WBZ	Weiße Blutzellen
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Stim	Stromal interaction molecule
Orai1	Calcium release-activated calcium channel protein 1
<i>KCNN3</i>	Gen: potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
<i>KCNN4</i>	Gen: potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4

Einheiten

Masseneinheiten	
%	Prozent (von Hundert)
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter

Bilder/s	Bilder pro Sekunde
cm	Zentimeter
dl	Deziliter
FSC	Forward-Scatter
g	Gramm
g (bei Zentrifugenangaben)	Erdbeschleunigung ($g=9,81 \text{ m/s}^2$)
h	hours (SI)= Stunden
kDa	kiloDalton
M	Mol
mA	Milliampere
min	minutes (SI) = Minuten
Mio	Millionen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	MilliMol
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
nm	Nanometer
nM	NanoMol
s	seconds (SI) = Sekunden
t	Tausend
RFU	Relative Fluorescent Unit = Relative Fluoreszenzeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

10 Referenzen

- Armstrong, R. A. (1996). "Platelet prostanoid receptors." Pharmacol Ther 72(3): 171-91.
- Bolz, S. S., B. Fisslthaler, et al. (2000). "Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries." Faseb J 14(2): 255-60.
- Bombeli, T., B. R. Schwartz, et al. (1998). "Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha v beta 3 integrin, and GPIIb/IIIa." J Exp Med 187(3): 329-39.
- Borgdorff, P., G. J. Tangelder, et al. (2006). "Cyclooxygenase-2 inhibitors enhance shear stress-induced platelet aggregation." J Am Coll Cardiol 48(4): 817-23.
- Brauner, T., D. F. Hulser, et al. (1984). "Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes." Biochim Biophys Acta 771(2): 208-16.
- Bronner, C. and Y. Landry (1991). "The use of the potential-sensitive fluorescent probe bisoxonol in mast cells." Biochim Biophys Acta 1070(2): 321-31.
- Buerkle, M. A., S. Lehrer, et al. (2004). "Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 Enhances Platelet Adhesion in Hamster Arterioles In Vivo." Circulation 110(14): 2053-2059.
- Burger, P. C. and D. D. Wagner (2003). "Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development." Blood 101(7): 2661-6.

- Busse, R., A. Luckhoff, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 336(5): 566-71.
- Cattaneo, M. (2007). "Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs." Expert Rev Cardiovasc Ther 5(1): 45-55.
- Cattaneo, M., A. Lecchi, et al. (2000). "Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A2 production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2CYC receptors." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(11): E101-6.
- Coughlin, S. R. (1993). "Thrombin receptor structure and function." Thromb Haemost 70(1): 184-7.
- Coughlin, S. R. (2001). "Protease-activated receptors in vascular biology." Thromb Haemost 86(1): 298-307.
- Daniel, J. L., C. Dangelmaier, et al. (1998). "Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets." J Biol Chem 273(4): 2024-9.
- de Silva, H. A., J. G. Carver, et al. (1997). "Pharmacological evidence of calcium-activated and voltage-gated potassium channels in human platelets." Clin Sci (Lond) 93(3): 249-55.
- Denis, C., N. Methia, et al. (1998). "A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A 95(16): 9524-9.
- Dittrich, M., I. Birschmann, et al. (2008). "Platelet protein interactions: map, signaling components, and phosphorylation groundstate." Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(7): 1326-31.

- Dong, Z. M., S. M. Chapman, et al. (1998). "The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis." J Clin Invest 102(1): 145-52.
- Dorsam, R. T., S. Murugappan, et al. (2003). "Clopidogrel: Interactions with the P2Y12 Receptor and Clinical Relevance." Hematology 8(6): 359-65.
- Endrich, B., K. Asaishi, et al. (1980). "Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters." Res Exp Med (Berl) 177(2): 125-34.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2006). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?" Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(6): 1215-25.
- Fleming, I. (2004). "Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s)." Pharmacol Res 49(6): 525-33.
- Gachet, C. (2001). "ADP receptors of platelets and their inhibition." Thromb Haemost 86(1): 222-32.
- Gambaryan, S., A. Kobsar, et al. (2008). "NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity." J Thromb Haemost 6(8): 1376-84.
- Gawaz, M. (1999). Das Blutblättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung, Georg Thieme Verlag.
- Gawaz, M., F. J. Neumann, et al. (1997). "Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction." Circulation 96(6): 1809-18.
- Gawaz, M., F. J. Neumann, et al. (1996). "Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty." Circulation 93(2): 229-37.

- Grgic, I., B. P. Kaistha, et al. (2008). "Disruption of the Gardos channel (K(Ca)_{3.1}) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly." Pflugers Arch.
- Gryglewski, R. J., A. Dembinska-Kiec, et al. (1978). "A possible role of thromboxane A₂ (TXA₂) and prostacyclin (PGI₂) in circulation." Acta Biol Med Ger 37(5-6): 715-23.
- Gutman, G. A., R. Aldrich, et al. (15.10.2009). "Calcium-Activated Potassium Channels." Retrieved 01.08.2010, from <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=69>.
- Hassock, S. R., M. X. Zhu, et al. (2002). "Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel." Blood 100(8): 2801-11.
- Henn, V., J. R. Slupsky, et al. (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." Nature 391(6667): 591-4.
- Huo, Y., A. Schober, et al. (2003). "Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E." Nat Med 9(1): 61-7.
- Jandrot-Perrus, M., S. Busfield, et al. (2000). "Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily." Blood 96(5): 1798-807.
- Jennings, L. K. (2009). "Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis." Thromb Haemost 102(2): 248-57.
- Jorgensen, L. (2005). "ADP-induced platelet aggregation in the microcirculation of pig myocardium and rabbit kidneys." J Thromb Haemost 3(6): 1119-24.
- Klinke, R. and S. Silbernagl (2001). Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart, Thieme Verlag. 2.

- Krötz, F., N. Hellwig, et al. (2009). "A sulfaphenazole-sensitive EDHF opposes platelet-endothelium interactions in vitro and in the hamster microcirculation in vivo." Cardiovasc Res.
- Krötz, F., T. Riexinger, et al. (2004). "Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(3): 595-600.
- Krötz, F., T. M. Schiele, et al. (2005). "Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction." J Vasc Res 42(4): 312-24.
- Li, P. L. and W. B. Campbell (1997). "Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein." Circ Res 80(6): 877-84.
- Libby, P. and G. K. Hansson (1991). "Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions." Lab Invest 64(1): 5-15.
- MacIntyre, D. E. and T. J. Rink (1982). "The role of platelet membrane potential in the initiation of platelet aggregation." Thromb Haemost 47(1): 22-6.
- MacKenzie, A. B., M. P. Mahaut-Smith, et al. (1996). "Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets." J Biol Chem 271(6): 2879-81.
- Mahaut-Smith, M. P. (1995). "Calcium-activated potassium channels in human platelets." J Physiol 484 (Pt 1): 15-24.
- Mahaut-Smith, M. P., T. J. Rink, et al. (1990a). "Voltage-gated potassium channels and the control of membrane potential in human platelets." J Physiol 428: 723-35.

- Mahaut-Smith, M. P., S. O. Sage, et al. (1990b). "Receptor-activated single channels in intact human platelets." J Biol Chem 265(18): 10479-83.
- Manka, D., S. B. Forlow, et al. (2004). "Critical role of platelet P-selectin in the response to arterial injury in apolipoprotein-E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(6): 1124-9.
- Massberg, S., G. Enders, et al. (1998). "Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin." Blood 92(2): 507-15.
- Massberg, S., M. Sausbier, et al. (1999). "Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I." J Exp Med 189(8): 1255-64.
- Massberg, S., K. Schurzinger, et al. (2005). "Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb." Circulation 112(8): 1180-8.
- McClelland, S., M. Gawaz, et al. (2009). "Contribution of cyclooxygenase-1 to thromboxane formation, platelet-vessel wall interactions and atherosclerosis in the ApoE null mouse." Atherosclerosis 202(1): 84-91.
- Moncada, S., R. Gryglewski, et al. (1976a). "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." Nature 263(5579): 663-5.
- Moncada, S., P. Needleman, et al. (1976b). "Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition." Prostaglandins 12(3): 323-35.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, et al. (2001). "Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen." EMBO J 20(9): 2120-30.
- Nieswandt, B. and S. P. Watson (2003). "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?" Blood 102(2): 449-61.

- Oltman, C. L., N. L. Weintraub, et al. (1998). "Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation." Circ Res 83(9): 932-9.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature 327(6122): 524-6.
- Paul, B. Z., J. L. Daniel, et al. (1999). "Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change." J Biol Chem 274(40): 28293-300.
- Pipili, E. (1985). "Platelet membrane potential: simultaneous measurement of diSC3(5) fluorescence and optical density." Thromb Haemost 54(3): 645-9.
- Quilley, J. and J. C. McGiff (2000). "Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid?" Trends Pharmacol Sci 21(4): 121-4.
- Scheuerer, B., M. Ernst, et al. (2000). "The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages." Blood 95(4): 1158-66.
- Schmidt, R. F., G. Thews, et al. (2000). Physiologie des Menschen. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag.
- Si, H., W. T. Heyken, et al. (2006). "Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel." Circ Res 99(5): 537-44.
- Siess, W. (1989). "Molecular mechanisms of platelet activation." Physiol Rev 69(1): 58-178.
- Sowa, J. M., S. A. Crist, et al. (2009). "Platelet influence on T- and B-cell responses." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 57(4): 235-41.

Statistisches-Bundesamt.

(2009).

from

<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigation/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.psml>.

Struthmann, L., N. Hellwig, et al. (2009). "Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo." J Thromb Haemost 7(10): 1727-35.

Theilmeyer, G., C. Michiels, et al. (2002). "Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia." Blood 99(12): 4486-93.

Tolhurst, G., R. N. Carter, et al. (2008). "Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes." Platelets 19(4): 308-13.

van Gils, J. M., J. J. Zwaginga, et al. (2009). "Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases." J Leukoc Biol 85(2): 195-204.

van Hinsbergh, V. W. (2001). "The endothelium: vascular control of haemostasis." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 95(2): 198-201.

Varga-Szabo, D., I. Pleines, et al. (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(3): 403-12.

Varon, D. and E. Shai (2009). "Role of platelet-derived microparticles in angiogenesis and tumor progression." Discov Med 8(43): 237-41.

Vinten-Johansen, J., V. H. Thourani, et al. (1999). "Broad-spectrum cardioprotection with adenosine." Ann Thorac Surg 68(5): 1942-8.

Waggoner, A. (1976). "Optical probes of membrane potential." J Membr Biol 27(4): 317-34.

- Weber, C. (2005). "Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime." Circ Res 96(6): 612-6.
- Wei, A. D., G. A. Gutman, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels." Pharmacol Rev 57(4): 463-72.
- Widmann, M. D., N. L. Weintraub, et al. (1998). "Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo." Am J Physiol 274(1 Pt 2): H283-9.
- Wofle, S. E., V. J. Schmidt, et al. (2009). "Prominent role of KCa3.1 in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo." Cardiovasc Res.